



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
HEMATOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**NUEVAS MODALIDADES DE
INMUNOPROFILAXIS EN TRASPLANTE:
INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA**

Cristina Calderón Cabrera
Sevilla 2017

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

D. José Antonio Pérez-Simón, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “NUEVAS MODALIDADES DE INMUNOPROFILAXIS EN TRASPLANTE” realizado por la licenciada Cristina Calderón Cabrera bajo su dirección en el Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla, 26 de Junio de 2017

Fdo. Dr.

Departamento de Medicina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Dña. Teresa Caballero Velázquez, Doctora en Medicina por la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “NUEVAS MODALIDADES DE INMUNOPROFILAXIS EN TRASPLANTE” realizado por la licenciada Cristina Calderón Cabrera bajo su dirección en el Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla, 26 de Junio de 2017

Fdo. Dr.

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

D. José López Barneo, Profesor Titular del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “NUEVAS MODALIDADES DE INMUNOPROFILAXIS EN TRASPLANTE” realizado por la licenciada Cristina Calderón Cabrera bajo su dirección en el Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Sevilla, 26 de Junio de 2017

Fdo. Dr.

Agradecimientos

A mi director Jose Antonio Pérez Simón, por sustentar todo el trabajo en el que se basa esta tesis, brindarme la oportunidad de trabajar en un área fascinante y confiar en mi.

A mi directora y amiga Teresa Caballero, por su dedicación personal a este proyecto, su trabajo y apoyo y los buenos momentos compartidos.

A Estefanía García, por su indispensable trabajo y gran profesionalidad.

A Luis-Ignacio Sánchez-Abarca por todo lo que me enseñó el tiempo que pudimos disfrutar de él en Sevilla.

A Paco Márquez, por el análisis estadístico y su talento.

A Paola y a Ana, por su ayuda con el trabajo técnico y su siempre amable colaboración.

A los investigadores de los centros que han participado en el ensayo de esta tesis, por hacerla posible con su cooperación.

A mis compañeros y amigos hematólogos, cuya carrera profesional y humana me inspira cada día desde que comencé la especialidad.

A los enfermeros, auxiliares y técnicos de nuestro servicio, por regalarme momentos tan especiales.

A mis pacientes, por todo lo que me enseñan cada día.

A mis padres, mis referentes, por enseñarme a luchar y luchar conmigo. Por sus valores, por educarnos en lo verdaderamente importante.

A mis dos hermanas, mis mejores amigas, por su paciencia y por estar siempre a mi lado de forma incondicional.

A Álvaro, mi marido, por hacerme una persona feliz. Porque sin él nada hubiese sido posible.

A Carmen, por ser tan grande.

ABREVIATURAS

Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
APCs: (antigen presenting cells) células presentadoras de antígenos
ATG: timoglobulina
BAAF factor activador de células B
BCR (B cell receptor BCR) receptor de célula B
BTK: tirosina cinasa de Bruton
Bz: bortezomib
CCL2-5: chemokine (C-C motif) ligand 2-5
CIBMTR: Center for International Blood & Marrow Transplant Research
CLR: (C-type lectin receptors) receptores
CMV: citomegalovirus
CSA: ciclosporina-A
CTC: common toxicity criteria
CTLA-4: (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) antígeno 4 del linfocito T citotóxico
CXCL9-11: Chemokine (C-X-C motif) ligand 9-11
DAG: diacilglicerol
DCs: (dendritic cells) células dendríticas
EBMT: (European Bone Marrow Transplantation) Grupo Europeo de Transplante de Médula
EE enfermedad estable
EICL: efecto injerto contra leucemia
EICR: enfermedad injerto contra receptor
ELISPOT: (Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay): ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos
FoxP3: forkhead box P3
GITR: (d glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein)
GEM Grupo Español de Mieloma
HLA: (human leucocyte antigen) antígeno leucocitario humano
ICOS: (inducible coestimulator) coestimulador inducible, CD278
IFN γ : interferon γ
IL-7: Interleucina 7
IMiDs: pequeñas moléculas inhibidoras de vías de señalización intracelular
IPEX: síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado a X
IP3: inositol 1,4,5-trifosfato
I κ B inhibidore de kappa B
ITAM: (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)
Itk: tirosina cinasa
JAK: janus kinases

LPS: lipopolisacárido
mHA: antígenos menores de histocompatibilidad
MHC: (major histocompatibility complex) complejo mayor de histocompatibilidad
MAPK mitogen-activated protein kinase
MBRP muy buena respuesta parcial
MTX: metotrexate
NIH: National Institute of Health Consensus Development Project
mTOR: (mammalian Target of Rapamycin) diana de rapamicina en células de mamífero
MMF micofenolato mofetilo
NCI: National Cancer Institute
NFAT: (Nuclear factor of activated T cells) factor nuclear de células activadas
NF- κ B: factor nuclear kappa B
NFAT o JNK (Jun N-terminal Kinases)
NK: Natural Killer
PKC: (protein Kinase-C) proteína quinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PD-1: (programmed death 1) muerte programada 1
PIP3: trifosfato de fosfatidilinositol
PRR: receptores de reconocimiento de patrones
PUCB: proteína de unión de células B
RIC: reduced intensity conditioning
RC remisión completa
RP respuesta parcial
STAT5: Signal transducer and activator of transcription 5
TAP: transporter associated with antigen processing
TASPE: trasplante autólogo de progenitores hem
TCR: receptor del linfocito T
Treg: linfocitos T reguladores
TNF α : factor de necrosis tumoral α
TLR: (Toll-like receptors) receptores Toll
TexMACS (medio definido de cultivo de células T libre de suero)
VEB: virus de Epstein Barr

ÍNDICE

ÍNDICE

Pág.

RESUMEN.....	25
 INTRODUCCIÓN.....	 31
1. ALORREACTIVIDAD.....	32
1.1. El sistema inmune.....	32
1.2. Histocompatibilidad y trasplante.....	34
1.2.1. Complejo mayor de histocompatibilidad.....	36
1.3. La activación del linfocito T.....	38
1.4. Tolerancia inmunitaria.....	44
1.4.1. Células dendríticas.....	46
1.4.2. Linfocitos T reguladores.....	48
1.5. Concepto de alorreactividad.....	51
1.5.1. Bases moleculares de la alorreactividad.....	54
1.5.2. Activación de los linfocitos alorreactivos.....	58
2. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR.....	59
2.1. Fisiopatología de la EICR.....	60
2.1.1. Fisiopatología de la EICR aguda.....	60
2.1.2. Fisiopatología de la EICR crónica.....	69
2.2. Presentación clínica de la EICR.....	75
2.2.1. Clínica de la EICR aguda.....	75
2.2.2. Clínica de la EICR crónica.....	81
2.3. Profilaxis de la EICR.....	83

2.3.1. Profilaxis de la EICR aguda.....	83
2.3.1.1. Estrategias actuales de profilaxis de EICR aguda.....	85
2.3.1.1.1. Estrategias estándar: antimetabolitos e inhibidores de calcineurina.....	85
2.3.1.1.2. Estrategias de depleción T.....	91
2.3.1.2. Nuevas estrategias de profilaxis de EICR aguda.....	93
2.3.2. Profilaxis de la EICR crónica.....	105
3. ALODEPLECIÓN.....	107
4. MIELOMA MÚLTIPLE Y TRASPLANTE ALOGÉNICO.....	116

HIPÓTESIS.....	129
----------------	-----

OBJETIVOS.....	131
----------------	-----

MATERIAL Y MÉTODOS.....	133
-------------------------	-----

1. En relación con el efecto de bortezomib empleado <i>in vitro</i> en la profilaxis de EICR (ALODEPLETE).....	134
1.1. Condiciones del cultivo mixto.....	134
1.2. Efecto de la congelación en el cultivo mixto.....	136
1.3. Validación del producto alodeplecionado.....	136
2. En relación con el efecto de bortezomib empleado <i>in vivo</i> en la profilaxis de EICR (EMN).....	138
2.1. Pacientes.....	138
2.1.1. Diseño del estudio.....	138
2.1.2. Criterios de elegibilidad.....	139
2.1.3. Criterios para valoración de la seguridad.....	140

2.1.4. Selección de donante.....	141
2.1.5. Acondicionamiento.....	141
2.1.6. Profilaxis infecciosa.....	142
2.1.7. Profilaxis de la EICR.....	142
2.1.8. Procedimientos de las visitas de seguimiento.....	143
2.1.9. Muestras biológicas.....	143
2.1.10. Análisis estadístico.....	144
2.2. Métodos.....	146
2.2.1. Materiales.....	146
2.2.2. Estudio de antígenos de membrana.....	149
2.2.2.1. Análisis inmunofenotípico de las poblacionesde granulocitos, monocitos y DCs.....	152
2.2.2.2. Subpoblaciones linfocitarias.....	156
2.2.2.3. Análisis inmunofenotípico de linfocitos T naive/memoria/efector.....	158
2.2.2.4. Análisis inmunofenotípico de células NK.....	159
2.2.3. Estudio de linfocitos T reguladores.....	161
2.2.4. Activación de linfocitos.....	162
2.2.5. Separación inmunomagnética de linfocitos B de memoria CD27+ y análisis de quimerismo en poblaciones separadas.....	164
2.2.6. Análisis estadístico.....	165

RESULTADOS..... 169

1. En relación con el efecto de bortezomib empleado <i>in vitro</i> en la profilaxis de EICR (<i>ALODEPLETE</i>).....	170
1.1. Puesta a punto del procedimiento de cultivo mixto (n=12).....	170

1.2. Puesta a punto del cultivo mixto: paso a bolsa	
BAG-100 (n=8).....	179
1.3. Puesta a punto del cultivo mixto en bolsa	
BAG-250 (n=4).....	183
1.4. Producto alodeplecionado.....	185
1.4.1. ELISPOT.....	185
1.4.2. Citotoxicidad y activación del producto alodeplecionado (n=3).....	187
1.5. Combinación terapéutica de bortezomib y ciclofosfamida (n=4).....	191
1.6. Monitorización de poblaciones celulares y respuesta inmune postrasplante.....	194
2. En relación con el efecto de bortezomib empleado <i>in vivo</i> en la profilaxis de EICR (EMN).....	199
2.1. Pacientes.....	199
2.2. Datos relacionados con el trasplante.....	202
2.3. EICR aguda y crónica.....	205
2.4. Evolución postrasplante.....	207
2.5. Estudios de inmunofenotipo.....	212
2.5.1. Poblaciones de granulocitos, monocitos y DCs.....	212
2.5.1.1. Estudio de granulocitos neutrófilos, eosinófilos y basófilos.....	212
2.5.1.2. Estudio de DCs.....	213
2.5.2. Distribución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias.....	215
2.5.2.1. Linfocitos B y T.....	215
2.5.2.2. Linfocitos T naive/memoria/efector.....	219
2.5.2.3. Linfocitos T reguladores.....	223
2.5.2.4. Células NK.....	224

2.5.3. Activación linfocitaria.....	226
2.6. Quimerismo en linfocitos B de memoria CD27+.....	228

DISCUSIÓN.....	231
-----------------------	------------

CONCLUSIONES.....	247
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA.....	251
--------------------------	------------

ANEXO: RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.....	297
---	------------

RESUMEN

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es una opción potencialmente curativa para numerosos pacientes con hemopatías malignas debido principalmente al régimen de acondicionamiento y al efecto injerto contra leucemia/tumor (EICL) mediado por las células inmunes del donante. Sin embargo, la enfermedad injerto contra receptor (EICR) continua siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad tras el trasplante. De hecho, hoy en día aún no disponemos de ningún procedimiento que separe EICL de EICR.

En este sentido, la depleción de linfocitos del donante T es una estrategia prometedora pero al mismo tiempo no selectiva, que, si bien puede proteger de la EICR, implica un mayor riesgo de recaída y de infecciones graves.

Basándonos en los resultados de estudios preclínicos realizados por nuestro grupo en los que demostramos que, bortezomib, inhibidor del proteosoma empleado actualmente en el tratamiento del mieloma múltiple, era capaz de provocar un efecto proapoptótico muy selectivo frente a linfocitos alorreactivos, preservando la viabilidad de los linfocitos en reposo, desarrollamos un procedimiento que permitiese generar un producto consistente en linfocitos alodeplecionados que mantuvieran el efecto antitumoral del inóculo y su reactividad frente a patógenos en el contexto del trasplante

hematopoyético. Para ello, observamos en el cultivo mixto que la activación óptima de linfocitos T alorreactivos se producía con una proporción 3:1 de linfocitos respondedores : células estimuladoras y que la depleción de linfocitos T dentro de las células estimuladoras aumentaba la capacidad de estimular la activación linfocitaria en la fracción respondedora. Además, testamos distintas concentraciones de bortezomib concluyendo que para generar la máxima alodepleción, ésta debía estar entre 10 y 12 nM. Dado el número creciente de trasplantes con ciclofosfamida postrasplante como profilaxis de EICR, testamos la adición de ciclofosfamida a bortezomib *in vitro*, pero no se observó efecto sinérgico.

Por otro lado, llevamos a cabo un ensayo clínico con el fin de evaluar *in vivo* el efecto sinérgico *in vitro*, ya reportado por nuestro grupo, de bortezomib y sirolimus en la prevención de la EICR. Para ello, incluimos 25 pacientes (23 con diagnóstico de mieloma múltiple y 2 leucemias de células plasmáticas) que se sometieron a trasplante alogénico con acondicionamiento de intensidad reducida destacando que, a pesar de que únicamente 7 se trasplantaron en remisión completa, habiendo pacientes con hasta 8 líneas previas de tratamiento, comprobamos que a día +100, 14 estaban en remisión completa (67%), 1 en muy buena respuesta parcial (4%) y 4 (19%) en respuesta parcial. Además, con una mediana de seguimiento de 21.3 meses, la supervivencia global a 2 años era del 60% y la supervivencia libre de enfermedad del 24%,

datos muy relevantes teniendo en cuenta el subgrupo de pacientes de pronóstico pobre incluido. Pudimos comprobar que la combinación de bortezomib/rapamicina/tacrolimus es segura y eficaz como profilaxis de EICR. A diferencia de la mayoría de estudios reportados, el ensayo se acompañó de un estudio biológico minucioso en el que se pudieron encontrar diferencias significativas en relación con un grupo de sujetos sanos en el porcentaje de CDs plasmocitoides y de linfocitos B, inversión del ratio CD4/CD8, alteración en el repertorio de células NK bright y weak así como alteración en la distribución de naive/memoria/efector.

INTRODUCCIÓN

1. ALORREACTIVIDAD

1.1. El sistema inmune

El sistema inmune constituye una compleja red de estructuras y procesos biológicos cuyo principal objetivo es el reconocimiento del propio organismo mediante constantes interacciones de sus componentes, lo que le permite la identificación selectiva de lo extraño con el fin de neutralizarlo. En él están implicados un amplio repertorio de células y tejidos dirigidos y coordinados por diferentes moléculas.

Se puede diferenciar entre inmunidad innata y adaptativa, aunque existe una estrecha relación entre ambas [1, 2].

El sistema inmune innato es un sistema de defensa frente a patógenos que constituye la primera línea de defensa del huésped e incluye barreras físicas y químicas (epitelio y sustancias química antimicrobianas producidas por éstos), células fagocíticas (macrófagos neutrófilos), células dendríticas y linfocitos citolíticos naturales (en inglés Natural Killer, NK), proteínas sanguíneas incluido el sistema de complemento y otros mediadores de la inflamación y citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata. Reconoce lo no-propio a través de receptores seleccionados durante el curso de la evolución de la especie, los cuales

reconocen estructuras comunes y altamente conservadas en los patógenos (patrones asociados a patógenos). La inmunidad adaptativa es específica frente a diferentes antígenos microbianos y no microbianos y aumenta con exposiciones repetidas al antígeno. Incluye componentes celulares (linfocitos T y B) y humorales (anticuerpos). La especificidad de reconocimiento se basa en receptores generados por reordenamientos génicos y expresados en los linfocitos, que permiten un reconocimiento específico del antígeno. Las células presentadoras de antígenos (en inglés antigen presenting cells, APCs), tienen un papel esencial en la conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (en inglés major histocompatibility complex, MHC). En consecuencia, la inmunidad innata adquiere la función de iniciar, estimular y polarizar la respuesta adaptativa para así eliminar el germen y minimizar los daños causados al huésped [3, 4].

Los linfocitos son las células más características de la inmunidad adaptativa y las únicas que expresan receptores para el antígeno distribuidos de forma clonal cada uno con una especificidad exquisita frente a un determinante antigénico diferente. Los linfocitos B proporcionan defensa por medio de la secreción de anticuerpos. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos realizan su función defensiva eliminando las células que producen antígenos extraños, como las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares. Por el

contrario, los linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Th, helper) proporcionan una importante conexión entre la inmunidad específica y los mecanismos efectores de la inmunidad natural, promoviendo la proliferación y diferenciación de otros linfocitos y activando y reclutando células de la respuesta inmune innata. Los linfocitos necesitan de la colaboración de las células accesorias para su activación y regulación, que entran en contacto con el antígeno, lo procesan y lo presentan a los linfocitos cuando recirculan por los órganos linfoides secundarios, por ello también se denominan APCs. Las principales poblaciones de APCs son células dendríticas (en inglés dendritic cells, DC), monocito/macrófagos y células B cuya función principal es la presentación del antígeno y la emisión de señales coestimuladoras que activan a los linfocitos T y los capacitan para desarrollar sus funciones de reconocimiento y eliminación de antígenos. Además, cooperan entre sí y con los linfocitos en la regulación de la respuesta inmune mediante la producción de citoquinas y quimioquinas. La unión de la APC y el linfocito T es un proceso durante el cual tienen lugar las interacciones recíprocas esenciales para la activación o inhibición de los linfocitos T dependiendo de su papel dentro de la respuesta inmune [3, 5].

1.2. Histocompatibilidad y trasplante

La identidad de las células de cada individuo reside en un grupo de

moléculas expresadas en la membrana citoplasmática de las células nucleadas denominadas moléculas de histocompatibilidad, residiendo en estas moléculas la función de reconocimiento específico del sistema inmune.

El trasplante es un tratamiento usado ampliamente para sustituir órganos y tejidos que no funcionan por órganos o tejidos sanos. En concreto, el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es la única estrategia curativa en el tratamiento de numerosos pacientes con hemopatías malignas y hereditarias así como enfermedades de tipo inmune. Sin embargo, su potencial curativo y el número creciente de trasplantes llevados a cabo a nivel mundial están limitados por una alta tasa de complicaciones inmunes. Estos efectos secundarios se deben principalmente a la presencia de células inmunocompetentes de origen en el donante y el receptor y la consecuente situación de alorreactividad que se desencadena. Estas células reconocidas como extrañas o aloantígenos desencadenan respuestas inmunitarias celulares y humorales. Así, células inmunocompetentes como los linfocitos T presentes en el injerto hematopoyético son capaces de reconocer al huésped como extraño y contribuir significativamente a una reactividad anti-receptor (enfermedad injerto contra receptor, EICR) y anti-leucemia (efecto injerto contra leucemia, EICL). Por otro lado, el fallo de injerto es mediado principalmente por linfocitos T y células NK del receptor [7, 8].

1.2.1. Complejo mayor de histocompatibilidad

El reconocimiento de células trasplantadas como propias o extrañas está determinado por genes polimórficos, llamados genes de histocompatibilidad que difieren entre distintos miembros de una especie. Esta familia de genes ubicados en el cromosoma 6, denominado MHC, conforman el sistema HLA (en inglés human leucocyte antigen). Los genes del MHC se expresan de forma codominante en cada sujeto: cada progenitor contribuye a la mitad de los antígenos expresados en el MHC, constituyendo el conjunto de antígenos originarios de cada uno un haplotipo [9, 10].

Dependiendo de su distribución tisular, estructura bioquímica y propiedades funcionales existen dos clases de moléculas: MHC clase I y MHC clase II. En humanos, el MHC de clase I incluye HLA-A, HLA-B, HLA-C, y el CMH de clase II se denomina HLA-D. Existen al menos, cinco subregiones, incluyendo DR, DQ y DP.

Las moléculas de clase I se expresan de forma constitutiva en casi todas las células nucleadas, mientras que las moléculas de clase II se expresan solo en las células dendríticas, los linfocitos B, los macrófagos y algunos otros tipos celulares.

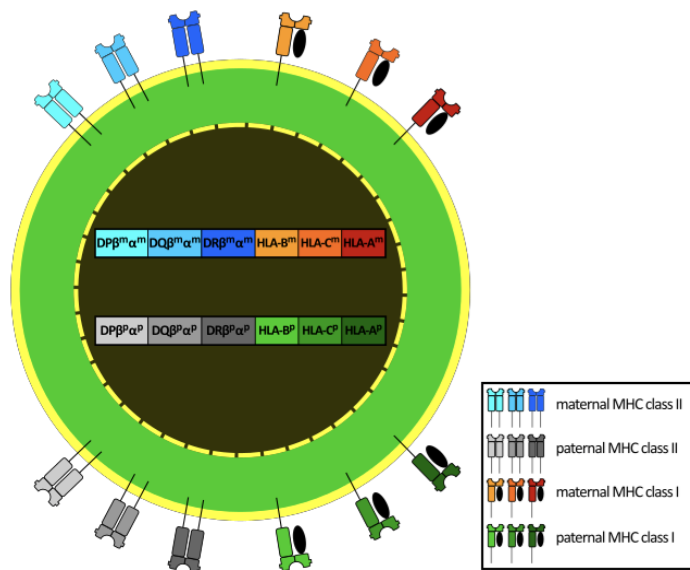


Figura 1. Complejo mayor de histocompatibilidad

La función del MHC de clase I es presentar proteínas intracelulares parcialmente degradadas a las células T. De esta manera, las células dañadas o infectadas por virus pueden ser identificadas por el sistema inmune. No obstante, cuando tiene lugar el trasplante, el reconocimiento de las moléculas de MHC por las células T se conoce como aloinmunidad y es la base de la EICH y del rechazo del injerto. La función del MHC de clase II es presentar proteínas extracelulares a los linfocitos T y esta función queda reservada para las células presentadoras de antígenos.

Los genes de la región del MHC son altamente polimórficos. Los hermanos HLA idénticos heredan las mismas dos copias del cromosoma 6 de

sus progenitores. Sin embargo, incluso en trasplantes de hermanos HLA idénticos se puede desarrollar EICH. Esto se explica porque las diferencias en las secuencias de las proteínas intracelulares físicamente asociadas con las moléculas del MHC están causadas por polimorfismos en genes que no pertenecen al MHC, tales como antígenos del grupo sanguíneo y moléculas de adhesión celular, entre otros. La mayoría de estos polimorfismos no están identificados, pero los que se conocen que causan respuesta alorreactiva por las células T se denominan “antígenos del complejo menor de histocompatibilidad” [10]. Aunque estos antígenos pueden no ser los responsables directos del rechazo del trasplante, los estudios de tipaje en humanos sugieren que contribuyen a la generación de la EICH [11, 12].

1.3. Activación del linfocito T

La proliferación de los linfocitos T y su diferenciación en células efectoras y memoria requieren el reconocimiento del antígeno, coestimulación y citocinas que producen los propios linfocitos T y las APC y otras células en el lugar del reconocimiento al antígeno. El antígeno unido al MHC es la primera señal necesaria para la activación de los linfocitos. En los órganos linfoides, las células dendríticas presentan péptidos derivados de antígenos proteicos extracelulares previamente endocitados, asociados a moléculas de clase II del MHC a los linfocitos vírgenes CD4⁺ o péptidos derivados de proteínas

citosólicas mostradas mediante moléculas de clase I del MHC a los linfocitos T CD8+. Así, los linfocitos T vírgenes requieren señales proporcionadas por moléculas expresadas en la membrana de las APCs, llamadas coestimuladores, además de la señal inducidas por el antígeno. En ausencia de esta segunda señal la respuesta del linfocito T es incompleta o anérgica [7]. La vía coestimuladora mejor caracterizada en la activación del linfocito T es la que implica CD28, que se une a las moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) expresadas en las APCs activadas [3, 13].

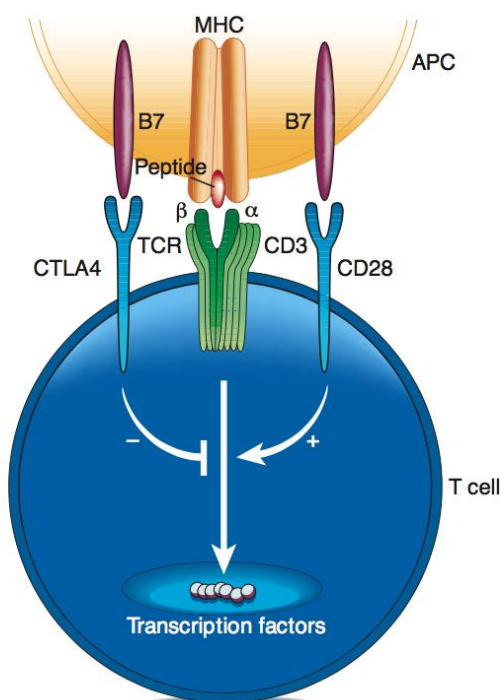


Figura 2. Regulación del linfocito T por CD28 y CTLA-4 [13]

B7-1 y B7-2 son glucoproteínas integrales membranas de cadena única con una estructura similar, cada una con dos dominios extracelulares del tipo inmunoglobulina aunque en la superficie celular B7-1 existe en forma de dímero y B7-2 en forma de monómero. El CD28 es un homodímero unidos por enlaces disulfuro y cada subunidad tiene un solo dominio extracelular de inmunoglobulina, Se expresa en más del 90% de los linfocitos TCD4+ y en el 50% de los linfocitos TCD8+. La expresión de los coestimuladores B7 está regulada y asegura que las respuestas del linfocito T se inicien en el momento y lugar adecuados. Las moléculas B7 se expresan sobre todo en las APC, incluidas las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Faltan o se expresan con baja intensidad en las APC en reposo y las inducen varios estímulos como los productos microbianos que se unen a los receptores toll y citocinas como el interferón γ , producidas durante las reacciones inmunitarias innatas. Por otro lado, los linfocitos T activados expresan el ligando para el CD40 en su superficie que se une al CD40 expresado en las APC y envía señales que potencian la expresión de los coestimuladores B7 en las APC. Las células dendríticas expresan las mayores cantidades de coestimuladores por lo que son los estimuladores más potentes de los linfocitos T vírgenes. Las APC inactivadas o en reposo en los tejidos normales son capaces de presentar antígenos propios a los linfocitos T pero como estas APC tisulares solo

expresan cantidades bajas de coestimuladores, los linfocitos T potencialmente autorreactivos que ven antígenos propios no se activan y pueden volverse anérgicos. Los linfocitos T reguladores también dependen de coestimulación mediada por B7:CD28 para su generación y mantenimiento [3].

Las unión de CD28 a su ligando activa varias vías de transmisión de señales, algunas de las cuales pueden amplificar señales procedentes del complejo TCR y otras pueden ser independientes aunque paralelas. La cola citoplásmica del CD28 comprende una estructura tirosínica que después de las fosforilación puede reclutar la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-cinasa). El CD28 ligado por sus ligandos B7 puede activar la PI3-cinasa y la Akt-cinasa y también facilita la activación de la vía MAP Ras/ERK. LA PI3-cinasa crea estructuras trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3) que pueden contribuir al reclutamiento y activación de la tirosina cinasa I κ k, las fosfolipasa PLC γ y otra cinasa llamada PDK1, que fosforila y activa Akt. Ésta a su vez fosforila varias dianas inactivando proteínas apoptósicas y activando factores antiapoptósicos, lo que contribuye a aumentar la supervivencia celular. Además, las señales de CD28 inducen la unión del factor nuclear *kappa* B (NF- κ B) a una zona situada en el promotor del gen de la IL-2 llamada centro de respuesta de CD28 que no se activa por señales procedentes del TCR. Se han identificado numerosos receptores homólogos al CD28 y sus ligandos homólogos a B7 y estas proteínas aumentan o disminuyen las respuestas de los

linfocitos T. El receptor para coestimulador diferente al CD28 cuya función es mejor conocida es ICOS (coestimulador inducible, del inglés *inducible coestimulator*, CD278). Su ligando, ICOS-L (CD275) se expresa en células dendríticas, los linfocitos B y otras poblaciones celulares. El ICOS desempeña una función esencial en las respuestas de anticuerpos dependientes del linfocito T, particularmente en la reacción que se produce en el centro germinal.

Las vías de señalización implicadas en la activación linfocitaria convergen finalmente en diferentes factores de transcripción, como NF- κ B (en inglés, nuclear factor kappa B), el factor de transcripción nuclear activador de proteína 1 (AP-1) o NFAT (Nuclear factor of activated T cells). Así como NF- κ B y AP-1 se relacionan con una respuesta inmunogénica, NFAT está implicado en procesos de respuesta inmunogénica y tolerogénica [14-17]. En particular, destacar el papel de NF- κ B, factor clave de transcripción implicado en la regulación de la respuesta inmune. Los estímulos que pueden inducir la actividad de NF- κ B son las infecciones víricas y bacterianas, las citoquinas proinflamatorias, la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y el estrés oxidativo [18]. En las células en reposo, los dímeros de NF- κ B están unidos a las proteínas inhibidoras de κ B (I κ B), las cuales secuestran los complejos de NF- κ B en el citoplasma. Tras la estimulación celular, tiene lugar la degradación de las proteínas I κ B mediante el inicio de fosforilaciones

por el complejo de las quinasas de I κ B (IKK), que incluye dos quinasas catalíticas activas, IKK α e IKK β y la subunidad reguladora IKK γ (NEMO). Las proteínas I κ B fosforiladas son marcadas para la ubiquitinación y degradación en el proteosoma, liberando los dímeros de NF- κ B y permitiendo su translocación al núcleo (Figura 3).

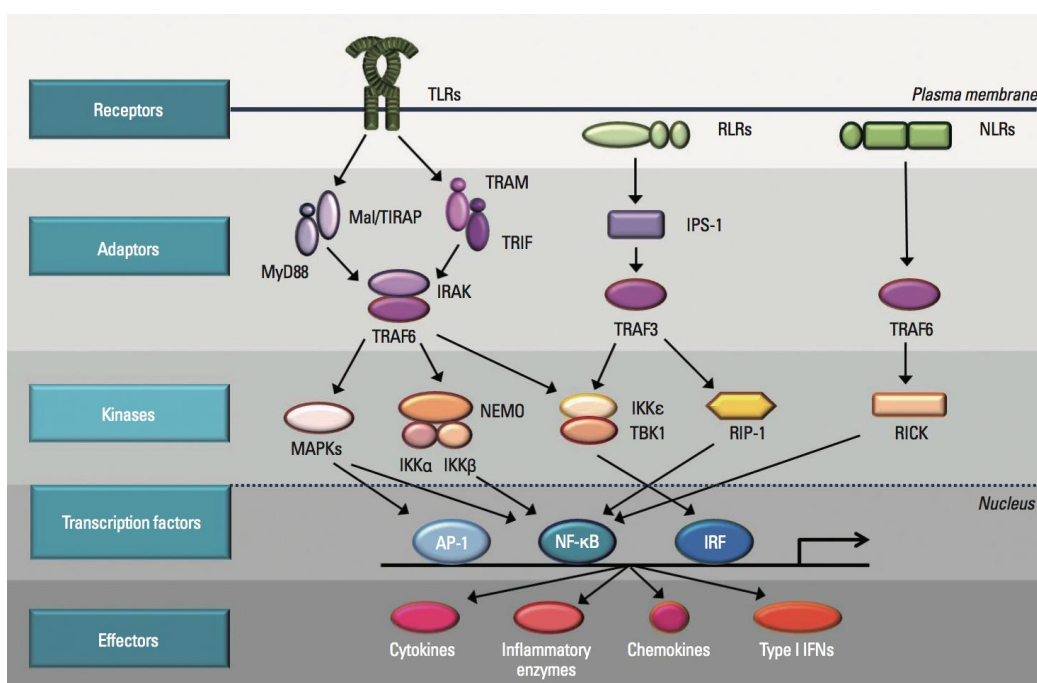


Figura 3. Vías de señalización de los PRR [19]

Por otro lado, el resultado de la activación del linfocito T está influido por un equilibrio entre la unión de los ligandos a los receptores activadores e inhibidores de la familia del CD28. Los receptores inhibidores de la familia del

CD28 son el CTLA-4 (antígeno del linfocito T citotóxico, del inglés cytotoxic T lymphocyte antigen 4) y la PD-1 (muerte programada 1, del inglés programmed death 1). CTLA-4 se une a moléculas B7 y tiene una mayor afinidad que el CD28 por éstas, impidiendo así que los coestimuladores B7 de las APC se unan al CD28. Además, también puede retirar moléculas B7 de la superficie de las APC y produce señales inhibitoras que niegan las señales producidas por el TCR. También es un mediador de la función inhibitora de los linfocitos T reguladores. Por otro lado, PD-1 reconoce 2 ligandos llamados PD-L1, que se expresa en las APC y muchas otras células tisulares y PD-L2, sobre todo en las APC. La unión de la PD-1 a cualquiera de sus ligandos lleva a una activación de los linfocitos T. Ambos receptores CTLA-4 y PD-1 participan en el fenómeno de la tolerancia y las anomalías en su expresión o función producen enfermedades autoinmunes [3].

1.4. Tolerancia inmunitaria

La tolerancia inmunitaria es la falta de respuesta a un antígeno inducida por la exposición mantenida y de baja intensidad de los linfocitos específicos a ese antígeno. La tolerancia inmune frente a antígenos propios se produce esencialmente en el timo (tolerancia central), donde los linfocitos autoreactivos son eliminados al igual que aquellos que no son capaces de interactuar con el MHC propio.

Si embargo, los mecanismos de tolerancia central pueden no ser completamente eficaces, y los linfocitos T autorreactivos escapan a esta selección negativa. Por ello, es necesaria la existencia de mecanismos periféricos de mantenimiento de la tolerancia y, a este nivel, hay dos poblaciones celulares clave: los linfocitos T reguladores (Treg) y las células dendríticas [7, 20].

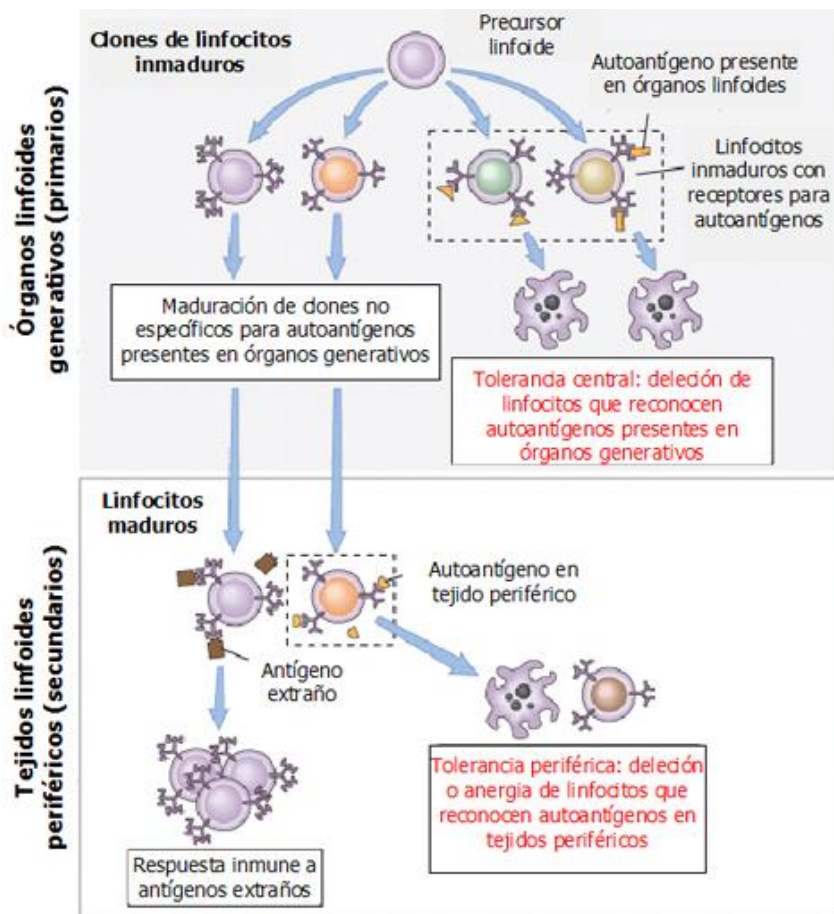


Figura 4. Tolerancia central y periférica frente a antígenos propios [3]

1.4.1. Células dendríticas

Las DCs son esenciales en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune. Tienen la función de presentar péptidos derivados de antígenos endógenos y exógenos a través de moléculas HLA de clase II.

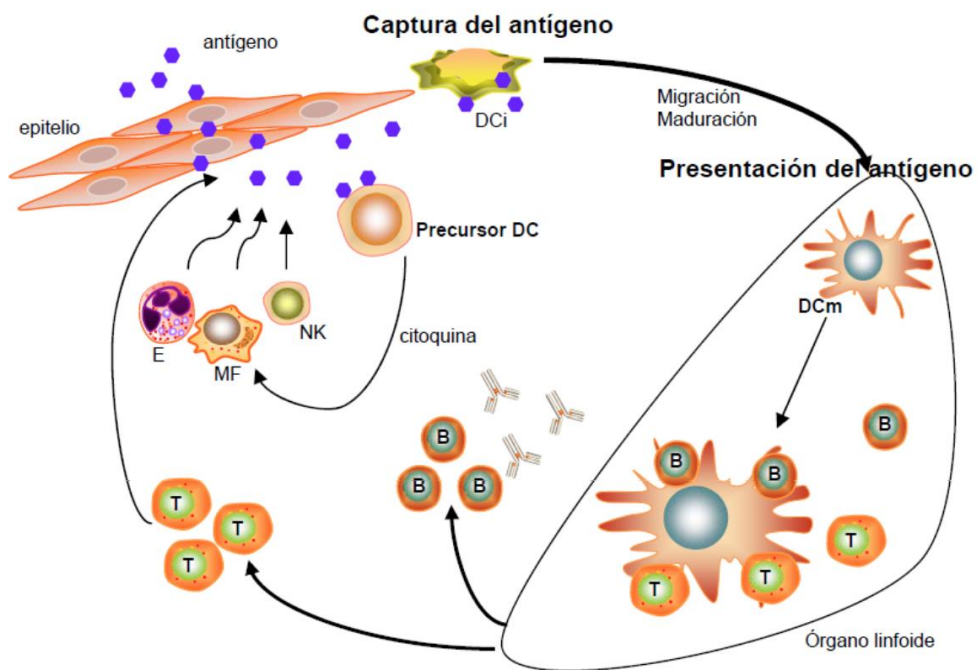


Figura 5. Proceso de presentación de antígeno por APC [21]

Para el control de las inmunidades innatas y adaptativas es necesario que las DCs se diferencien o maduren.

La maduración resulta en diversos cambios fenotípicos que incluyen

aumento en la producción de complejos péptido-MHC, expresión aumentada de moléculas de unión a linfocitos T y coestimuladoras y producción de novo de factores de crecimiento como IL-2, citoquinas y quimioquinas [7].

En situación basal, en el que se encuentran en un estado inactivo y no expresan moléculas coestimuladoras, el contacto con los linfocitos T genera una respuesta inmunotolerante [21]. Por otro lado, en situación de estrés o inflamación, las DCs maduran y se activan expresando moléculas coestimuladoras y dando lugar a una respuesta inmune frente al antígeno presentado [22, 23]. Si este proceso tiene lugar en presencia de citoquinas pro-inflamatorias, da lugar a la activación, expansión y maduración de células T.

Es conocido el papel de las DCs en el desarrollo de EICH mediada por linfocitos T CD4+. Aunque las moléculas HLA de clase I presentan péptidos preferentemente derivados de la síntesis de proteínas de la propia célula, siendo por tanto las células nucleadas del receptor fundamentales en el desarrollo de la EICH mediada por linfocitos T CD8+, las DCs del donante son capaces de llevar a cabo una presentación cruzada mediante la cual moléculas HLA de clase I presentan péptidos derivados de antígenos adquiridos exógenamente [24, 25].

Se han publicado diversos estudios que han relacionado el desarrollo de EICR con el estado de maduración de las CDs, del mismo modo que se ha descrito en modelos de EICR en ratón que el desarrollo de EICR cutáneo es

dependiente fundamentalmente de la función de las CDs del receptor mientras que en el caso del intestino están más implicadas las CDs del donante [26, 27].

1.4.2. Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (Treg) son una subpoblación especializada de linfocitos T cuya función es suprimir las respuestas inmunitarias y mantener la tolerancia frente a lo propio. Los Treg se originan en el timo como una subpoblación de linfocitos T funcionalmente maduros o, también, pueden ser inducidos a partir de una población de linfocitos T vírgenes en la circulación periférica.

En 1995, Sakaguchi y col [28] distinguieron una población de linfocitos T caracterizada porque tanto en ratón como en humano expresan basalmente CD25 (la cadena α del receptor de IL-2). Estos linfocitos suponen un 1-3% de la población total de linfocitos de sangre periférica y, en situación basal, intervienen en el mantenimiento de la tolerancia evitando la activación y proliferación de células T potencialmente autorreactivas que hayan sido capaces de escapar de la selección negativa del timo [29, 30].

Aunque se han descrito diferentes subtipos de linfocitos T con funciones reguladoras [31], los Treg naturales son la subpoblación mejor estudiada. La mayoría de estos linfocitos T CD4⁺ se caracterizan por expresar cantidades altas de la cadena alfa del receptor para la IL-2 (CD25) y la falta o baja

expresión de receptores para IL-7 (CD127) y, como se puede predecir a partir de este patrón de expresión de receptores, utilizan la IL-2 pero no la IL-7, como factor de crecimiento y supervivencia. También suelen expresar altas cantidades de CTLA-4.

El receptor de IL-2 actúa a través de diversas vías de señalización como son PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT y la vía MAPK. En el caso de los linfocitos Treg, la vía PI3K/AKT/mTOR se encuentra inhibida debido a una expresión incrementada de PTEN [32-36]. Esta propiedad confiere cierta resistencia natural de los Treg a la acción del sirolimus, lo que tiene importantes implicaciones terapéuticas en el contexto del trasplante y ha permitido la utilización de sirolimus para la expansión *in vitro* de linfocitos Treg, y además ha demostrado *in vivo* preservar la viabilidad y funcionalidad de los Treg [37-40]. Por ello, la señalización del receptor de IL-2 en los Treg está principalmente mediada por la activación de JAK1 y JAK3 (JAK: janus kinases) con la consecuente activación de STAT5 que da lugar a la sobreexpresión de FoxP3 [41, 42].

Un factor de transcripción llamado FoxP3 (forkhead box P3) es fundamental para el desarrollo y función de los linfocitos Treg [43-45]. La importancia del gen Foxp3 fue constatada por primera vez en la cepa de ratón Scurfy, en las que, las células T de esta cepa de ratón (deficientes de Foxp3) presentaban un estado constante de activación y respuesta excesiva a la

estimulación a través del TCR [46]. Mutaciones en este gen desencadenan en humanos el síndrome IPEX (síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado a X), caracterizado por graves fenómenos autoinmunes incluyendo enteropatía autoinmune, dermatitis, tiroiditis y diabetes tipo 1 [47].

La transcripción del factor Foxp3 es fundamental para que tenga lugar en el timo la diferenciación a Treg. La transducción de Foxp3 en las células T vírgenes regula la expresión de CD25 así como de otras moléculas de superficie tales como CTLA-4, CD62L y GITR (del inglés glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein) [48-50] mientras que reprime la producción de IL-2, interferon γ (IFN γ) e IL-4. La sobreexpresión de Foxp3 es suficiente para conferir actividad supresora a linfocitos T normales no reguladores.

S. Sakaguchi y col. describieron cómo la ausencia de linfocitos Treg provocaba el desarrollo de enfermedades autoinmunes en modelo murino [51]. En el contexto del trasplante alogénico alteraciones numéricas o funcionales de estos linfocitos se han relacionado con una mayor incidencia de EICR [52-56].

Es por esto que los Treg constituyen una diana prometedora en la búsqueda de nuevas estrategias dirigidas a preservar e incluso expandir los linfocitos Treg como profilaxis de la EICR en el contexto del trasplante alogénico.

Tabla 1. Marcadores de linfocitos T reguladores

	Tregs
Marcadores de superficie	CD25 alto CTLA-4 GITR CD127 (cadena α de IL-7R) bajo
Citocinas producidas tras activación	TGF- β , IL-10
Receptores para quimiocinas	CCR6
Factor de crecimiento requerido	IL-2
Principales factores de transcripción expresados	FoxP3, STAT5

1.5. Concepto de alorreactividad

El término de alorreactividad o alorreconocimiento define el hecho de que gran parte de los linfocitos T de un individuo son capaces de reconocer las moléculas de histocompatibilidad alogénicas [13].

Los linfocitos T reconocen antígenos en forma de péptidos unidos a moléculas MHC. Típicamente, tanto los péptidos propios como extraños son presentados por las moléculas CMH propias. Los linfocitos T primero reconocen los péptidos unidos a MHC expresados por APC del timo durante el desarrollo tímico. Los precursores T entran en el timo donde inicialmente se diferencian en linfocitos T inmaduros que expresan un receptor (TCR) capaz de

unirse a complejos péptido propio-MHC propio con una adecuada afinidad. Estos linfocitos T inmaduros reciben una señal de supervivencia (selección positiva) y forman un repertorio de linfocitos T con un MHC propio restringido, que puede interactuar con uno o más de los alelos MHC expresados. Además, el proceso de selección negativa elimina los linfocitos T potencialmente autoinmunes que tienen alta afinidad y/o reactividad cruzada (reacción entre un antígeno y un anticuerpo que fue generado contra un antígeno diferente pero similar) por complejos péptido propio-MHC propio. Tras el desarrollo tímico, los linfocitos T maduros se dirigen a sangre periférica donde el reconocimiento de péptido extraño-MHC propio inicia una respuesta inmune convencional mientras que la tolerancia frente a lo propio típicamente previene respuestas inmunes y por tanto la autoinmunidad frente a complejos péptido propio-MHC propio. Este proceso de reconocimiento antigénico convencional constituye la base de casi todas las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T. Una excepción notable es la alorreactividad [8]. Así, la alorreactividad se refiere a la habilidad de los linfocitos T de reconocer complejos péptido-MHC alogénicos a los que no se expusieron durante el desarrollo tímico. Es un fenómeno que indica la capacidad inherente de reactividad cruzada del TCR frente a un amplio rango de complejos péptido-CMH propios que podría ser beneficiosa para una vigilancia inmune de muchos potenciales patógenos [57].

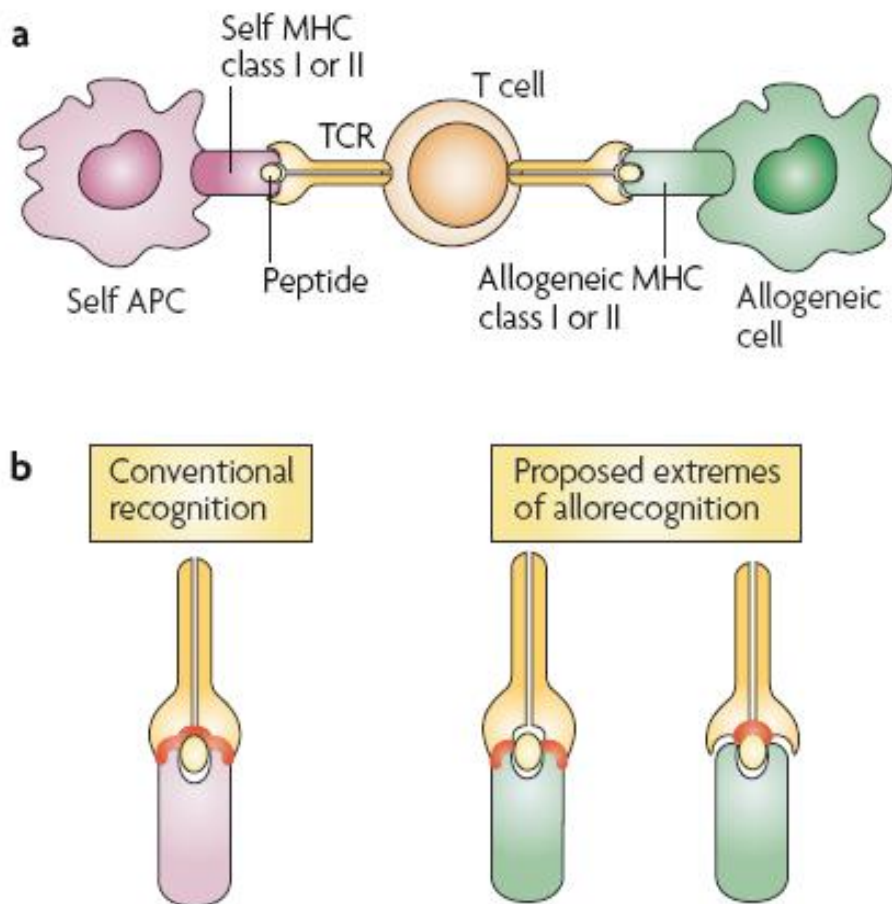


Figura 6. Reconocimiento de complejos convencionales y alogénicos por el linfocito T. a | Muchos TCRs pueden reconocer ambos complejos péptidos propios-CMH y péptidos alogénicos-CMH incluso aunque estos TCRs nunca se hayan enfrentado a las moléculas CMH alogénicas durante el desarrollo tímico. **b** | En el reconocimiento convencional de complejos péptido-CMH, el TCR contacta con ambos el péptido y la molécula CMH propia. En el alorreconocimiento, algunos modelos sugieren que el TCR contacta principalmente con la molécula CMH o el péptido. Sin embargo, muchos linfocitos T alorreactivos parecen interactuar con el complejo péptido-CMH de una forma idéntica al reconocimiento convencional [8].

Es más, la reactividad cruzada de TCR y epítomos antigénicos expresados por varios patógenos permiten una infección para reactivar linfocitos T memoria con distintas especificidades. Por lo tanto, la degeneración en el reconocimiento por el TCR permite al sistema inmune generar un repertorio de linfocitos T capaz de reconocer múltiples patógenos [58].

Sin embargo, en el contexto del trasplante de células o tejidos de un sujeto a otro con una composición genética distinta, el reconocimiento de antígenos del donante por linfocitos T del receptor en los órganos linfoides secundarios inicia la respuesta inmune adaptativa que conduce a problemas clínicos mayores como son el rechazo del trasplante y la EICR.

1.5.1. Bases moleculares de la alorreactividad

La base molecular de la alorreactividad ha sido ampliamente estudiada y debatida, si bien no está del todo establecida y distintos grupos han aportado avances en este campo centrándose en que la alorreactividad básicamente puede resultar de la reactividad cruzada sin imitación molecular y en otras ocasiones directamente de interacciones con superficies alogénicas de complejos péptido-CMH que imitan al ligando afín [59].

La alorreactividad puede explicarse por:

- Los polimorfismos del MHC: la alorreactividad es una consecuencia de una afinidad intrínseca del TCR por la superficie del MHC, pudiendo influir

factores como polimorfismos de aminoácidos en la región de unión peptídica, las hélices alfa del MHC así como el péptido unido al MHC.

- La superficie de contacto: el alorreconocimiento se distingue del reconocimiento convencional en cómo TCR contacta con el complejo péptido-molécula CMH alogénica, lo que puede ser explicado por interacciones entre el TCR y las moléculas MHC alogénicas que contienen polimorfismos y/o por interacciones con el péptido unido al CMH.

- La especificidad del péptido: ésta viene determinada por la similitud entre los alelos del MHC entre donante y receptor. La poliespecificidad podría explicar la mayoría de las respuestas alorreactivas.

Archbold et al estudiaron cómo los linfocitos T reaccionan frente a complejos péptido-CMH alogénicos. Para entender las interacciones del TCR afín con el complejo péptido-CMH, estudiaron la creciente base de datos de sus estructuras cocrystalinas, revelando éstas algunas de las características más importantes de estas interacciones específicas. Las estructuras cristalinas han mostrado que la plasticidad de los bucles de la región determinante de la complementariedad (CDR) del TCR podía explicar cómo los TCRs pueden adaptarse a antígenos estructuralmente diversos y generar por tanto reactividad cruzada [60]. Revisaron también la especificidad de la interacción alogénica del TCR con el péptido-CMH. Vieron que un gran número de factores pueden influir en la especificidad de las respuestas alogénicas de los linfocitos T. De

hecho, hay estudios recientes que sugerían que determinados loci de CMH son más importantes que otros para desencadenar respuestas alogénicas de linfocitos T [61-63]. Sin embargo, el aspecto más fundamental en el alorreconocimiento T es la naturaleza del alorreconocimiento y la razón para la anómala interrupción en la restricción del CMH. Finalmente, afirmaban que cuando el ligando afín y los alogénicos eran conocidos, las secuencias peptídicas parecían compartir rasgos estructurales pero no necesariamente similitud en la secuencia. De hecho, esa imitación molecular se piensa juega un papel en la reactividad cruzada receptor-ligando de muchos sistemas [64-68].

Por otro lado, hay trabajos muy relevantes como el de Colf y colaboradores [57], primer estudio en el que se disponían de un complejo péptido propio-CMH (H-2Kb) y otro alogénico (H-2Ld), permitiendo la comparación directa de cómo único TCR es capaz de reconocer dos ligandos distintos.

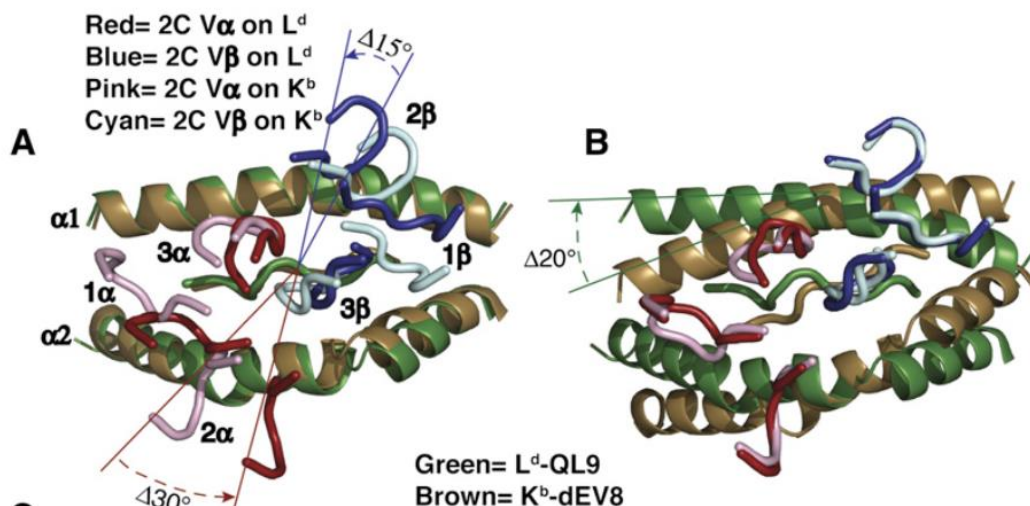


Figura 7. A. Dominios de alfa1alfa2 de Ld-QL9 y Kb-dEV8 en cada complejo 2C. B. En la superposición inversa a (A), el módulo VaVb 2C se superpuso desde cada complejo para ver las rotaciones relativas de las hélices del CMH [57].

Mientras que se ha postulado que el alorreconocimiento sería por imitación molecular, en este sistema se vio que solo cuatro de los residuos polimórficos que diferencian H-2Ld y H-2Kb se exponen en las hélices del CMH y están por tanto disponibles para la interacción directa con el TCR. Sin embargo, a pesar de la similitud de las superficies moleculares, el TCR 2C formado predominantemente por interacciones únicas entre las dos moléculas CMH sugiere que la unión al péptido es central. Estudios posteriores indicaron que en el sistema 2C las interacciones peptídicas no son dominadas por la orientación de la unión sino que el TCR 2C tiene dos sitios de unión únicos para las moléculas CMH singénicas y alogénicas. Allen et al mostraron por otro

lado el papel del péptido alogénico para lo que estudiaron una cohorte de TCRs alorreactivos que incluían TCRs alorreactivos que eran específicos para un único péptido-CMH y otros que reconocían dos o tres péptidos distintos unidos a la misma molécula CMH. La unión de ambos TCRs era sensible a sustituciones de alanina en el péptido, sugiriendo que a pesar de la poliespecificidad de un tipo de TCR, estos TCRs mantenían todavía interacciones altamente específicas. Así, estos estudios sugieren que el papel del péptido alogénico puede variar dependiendo del contexto de diferentes sistemas de alorreconocimiento y, además, las estrategias de unión usadas por los TCRs alorreactivos son más diversas de lo esperado.

1.5.2. Activación de los linfocitos alorreactivos

La interacción entre linfocitos T y moléculas CMH extrañas puede producirse de dos formas muy diferentes llamadas directa e indirecta. Así, en el alorreconocimiento directo, las células dendríticas presentan moléculas alogénicas del CMH a los linfocitos T provocando su activación. En el caso del alorreconocimiento indirecto, las células dendríticas del propio donante presentan proteínas del receptor a los linfocitos T del mismo donante. En ambos casos, los linfocitos T se activan y se diferencian en células efectoras [3].

2. ENFERMEDAD INJERTO CONTRA RECEPTOR

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es una opción potencialmente curativa para numerosos pacientes con hemopatías malignas debido principalmente al régimen de acondicionamiento y al efecto injerto contra leucemia/tumor mediado por las células inmunes del donante (principalmente linfocitos T) [68, 69]. El número de alo-TPH continúa aumentando con casi 20,000 llevados a cabo anualmente según los últimos datos del EBMT [70]. A pesar de los avances significativos en la última década en la selección de donantes y receptores, fuentes de progenitores hematopoyéticos, tratamiento de soporte, prevención de complicaciones y regímenes de intensidad reducida [71], la EICR continua siendo la principal causa de morbilidad tras el trasplante.

Hace 50 años Billingham formuló 3 requisitos para el desarrollo de la EICR [72]:

- a. El injerto debe contener células inmunocompetentes.
- b. El receptor debe expresar antígenos tisulares que no están presentes en el donante.
- c. El receptor debe ser incapaz de producir una respuesta efectiva para eliminar las células trasplantadas.

Actualmente, sabemos que estas células inmunocompetentes son linfocitos T y que la EICR puede desarrollarse en varios escenarios clínicos

cuando tejidos que contienen linfocitos T (hemoderivados, médula ósea y órganos sólidos) son transferidos de una persona inmunocompetente a otra incapaz de eliminarlos [69, 73, 74].

El alo-TPH es el escenario más común de desarrollo de la EICR, en el que los pacientes reciben quimioterapia con/sin radioterapia previa a la infusión de células hematopoyéticas que incluyen linfocitos T. Así, la EICR se produce cuando los linfocitos $T\alpha\beta$ maduros del donante responden a antígenos tisulares en el receptor debido a disparidades entre antígenos mayores o menores de histocompatibilidad presentados por las APCs, produciéndose como consecuencia una respuesta alorreactiva [69].

2.1. Fisiopatología de la EICR

2.1.1. Fisiopatología de la EICR aguda

La fisiopatología de la EICR aguda puede considerarse como un proceso de 3 pasos secuenciales en los que la inmunidad innata y adaptativa interaccionan [75-78]:

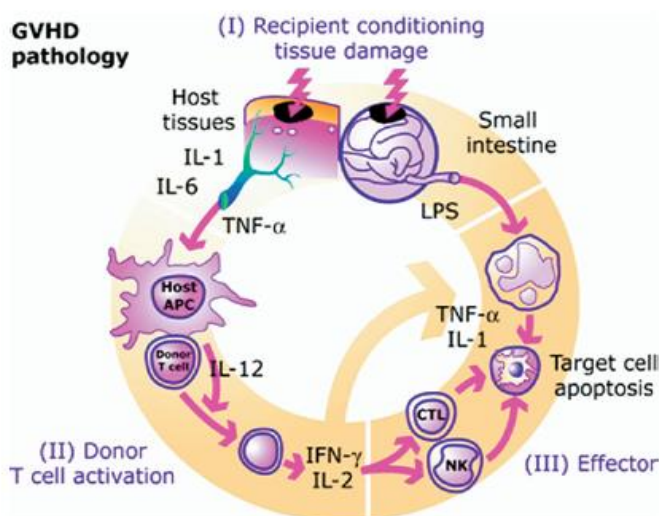


Figura 8. Las tres fases de la inmunobiología de la EICH [75]

Fase 1: Activación de células presentadoras de antígeno

En la primera fase, las CPA se activan debido a los daños tisulares derivados de la enfermedad de base, el régimen de acondicionamiento y procesos infecciosos intercurrentes.

Estos daños tisulares dan lugar a la secreción de citocinas proinflamatorias, como factor de necrosis tumoral α (TNF α) o IL-1, y quimioquinas, como CCL2-5 y CXCL9-11, que incrementan la expresión de moléculas de adhesión, antígenos del CMH y moléculas coestimuladoras en las CPA del huésped. La traslocación de productos microbianos inmunoestimuladores como el lipopolisacárido (LPS), como resultado del daño producido por el régimen de acondicionamiento en el tracto gastrointestinal, favorece la activación de las

CPAs del huésped [79, 80]. Distintos subtipos de CPAs, tanto del donante como del receptor, células dendríticas, células de Langerhans y monocitos/macrófagos están implicados en esta fase.

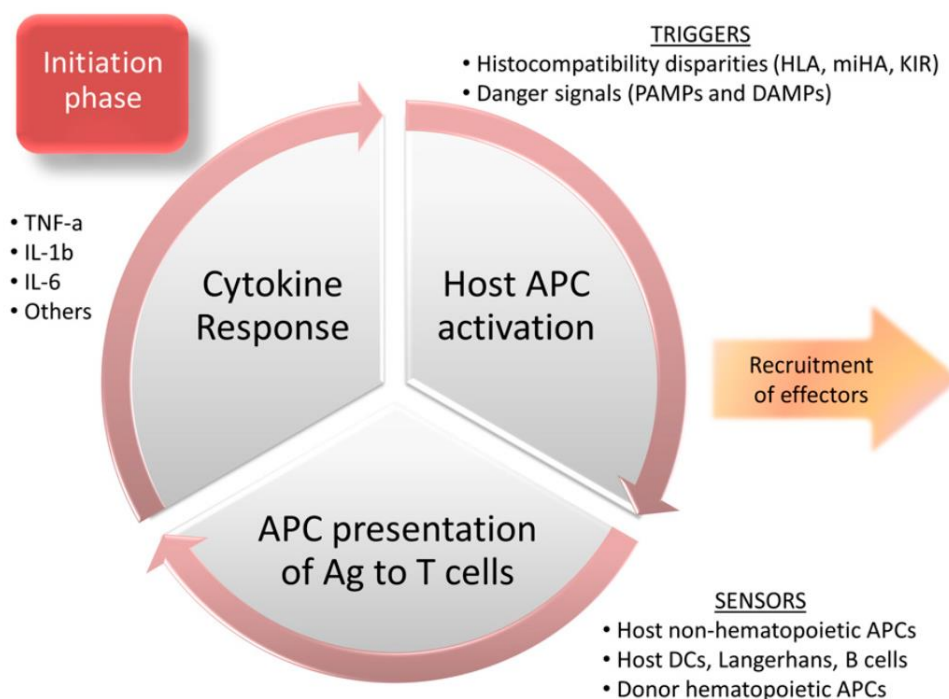


Figura 9. Fase 2: Activación de células T del donante [76]

Fase 2: Activación de células T del donante

Las células T del donante se activan, proliferan y diferencian en respuesta al estímulo procedente de las CPAs del huésped. Los receptores TCR de los

linfocitos T del donante reconocen aloantígenos en las CPAs del receptor que están presentes en los órganos linfoides secundarios [81, 82].

La activación y proliferación de los linfocitos T deriva en un aumento de la transcripción de genes de citoquinas y/o de sus receptores. Aunque las citoquinas Th1 o proinflamatorias (IFN gamma, IL2, y TNF alfa) induce principalmente la EICR, el balance entre las citoquinas Th1 y Th2 (IL-4, IL5, IL10 e IL13) es importante en la inmunopatogénesis de la EICR. En este sentido, el número de linfocitos productores de IL-2 se ha relacionado con la severidad de la EICR [83]. Para el comienzo de la expansión de los linfocitos T, además de la IL-2, también se necesita la interleuquina-15 (IL-15).

El IFN γ facilita la presentación de antígenos aumentando la expresión de moléculas de adhesión, de quimioquinas y de moléculas HLA y es además un mediador en el proceso de daño tisular. Por otra parte, las quimioquinas inflamatorias expresadas por los tejidos dañados son las responsables de la migración de las células inmunes a los órganos linfoides secundarios y a los tejidos diana. Los niveles de expresión de receptores de quimioquinas cambian con la estimulación celular. Se ha visto que los linfocitos T CCR5+, que generalmente producen citoquinas Th1, se asocian al desarrollo de EICR.

La IL-10 juega un papel clave en la supresión de la respuesta inmune pero su papel en la regulación de la EICR experimental no está bien definido,

aunque parece que existe una asociación entre los polimorfismos genéticos de IL-10 y la severidad de la EICR aguda. TGF β , otra citoquina supresora, suprime la EICR aguda pero exacerba la EICR crónica. El papel de otras citoquinas, como IL-7 o IL-13 no está claro. Tampoco se conoce con precisión el valor de las células Th17 en este contexto [84-90].

Para el desarrollo de la EICR se requiere que las células inmunocompetentes del injerto reconozcan proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad no expresadas en el donante, siendo también importantes las discrepancias a nivel de mHA en caso de sujetos HLA idénticos [91]. Algunos mHA como el antígeno específico de varón H-Y desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la EICR [92]. La presentación de estas proteínas se lleva a cabo tras un procesamiento en el que intervienen complejos enzimáticos a nivel citoplasmático (proteosomas, animopeptidasas) que dan lugar a péptidos de 8-10 aminoácidos. Estos son posteriormente transferidos al retículo endoplásmico mediante el transportador TAP (“transporter associated with antigen procesing”). En el retículo endoplásmico se unen a moléculas HLA de clase I, en el caso de proteínas endógenas, o a moléculas HLA de clase II en el caso de proteínas exógenas, hecho que ocurre en las CPAg tras endocitosis o tras interacción con receptores de membrana C-type lectin receptors (CLR) o Toll-like receptors (TLR). Todos estos aspectos son

importantes en la EICR porque esta intrincada maquinaria intracelular puede procesar de manera diferente en cada individuo una misma proteína y por tanto dicha proteína puede ser reconocida como extraña por el linfocito T en función de la célula que la presente. Por otra parte, la expresión de mHAs restringida a determinados órganos (como HA-1 y HA-2 en el tejido hematopoyético) abre la posibilidad de generar una respuesta inmune específica (efecto injerto contra leucemia). En todo este proceso, las CDs del paciente desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la EICR al presentar antígenos del receptor a los linfocitos del donante [77]. La maduración de las CDs en este contexto proinflamatorio del trasplante hace que éstas pasen a expresar moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD83, CD86 y producir citoquinas como IL-12 o IL-18, lo que conduce a la activación linfocitaria [93, 94].

Una vez que el antígeno ha sido procesado y presentado por la células dendrítica, la interacción del complejo HLA-antígeno con el receptor TCR-CD3 conduce a la activación de una serie de señales intracitoplasmáticas que finalmente provocan la activación linfocitaria. Sin embargo, para que el antígeno presentado por las DCs genere una respuesta inmunogénica, además de interactuar con el receptor TCR (señal 1), se debe producir también la activación de otras moléculas coestimuladoras en el linfocito T como CD28 o CD40L (señal 2). Una vez que el linfocito T interactúa con la DCs madura se activan una serie de tirosina quinasas que conducen a la fosforilación de ITAM

(immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) en la región intracitoplasmática del receptor TCR. Esto favorece el reclutamiento de ZAP-70 que a través de la Fosfolipasa C (PLC) genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) aumentando los niveles de Protein Kinasa-C (PKC) y calcio en el citosol. El calcio activa la fosfatasa CaN lo que produce el paso al núcleo de factores de transcripción como NF- κ B, NFAT o JNK (Jun N-terminal Kinases), induciendo la activación y proliferación linfocitaria. Estos mismos factores de transcripción son activados también a través de las rutas de Fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)-Akt (en inglés, protein kinase B o PKB) y MAPK (en inglés, mitogen-activated protein kinase), que dependen de la estimulación del linfocito a través de las señales coestimuladoras (señal 2). Finalmente, estas moléculas coestimuladoras también actuarían a través de CARMA-1, una proteína de membrana con actividad guanilato quinasa, que favorece el ensamblaje o acumulación de múltiples receptores en un “inmunosoma”. Este acumulo de alrededor de 20 receptores en 100-100nm de diámetro es necesario para generar una respuesta inmunogénica apropiada [95-97].

Todo este proceso de activación de los linfocitos T aloreactivos tiene lugar en los órganos linfoides secundarios tan sólo 2 a 4 días postrasplante. A partir de ese momento empiezan a migrar desde los órganos linfoides a los órganos diana

de la enfermedad injerto contra huésped, donde generarán el daño responsable de la EICR.

Fase 3: Fase efectora celular e inflamatoria

Durante la fase efectora de la EICR aguda tiene lugar una cascada completa de mediadores celulares e inflamatorios que sinergizan para amplificar el daño tisular local y los tejidos diana dañados. En la fase efectora están implicados aspectos de inmunidad innata y adaptativa así como interacciones con las células proinflamatorias y citoquinas generadas durante las fases 1 y 2.

- Efectores celulares: los linfocitos T citotóxicos (CTL) son los principales efectores de la EICR a través de una serie de mecanismos, tales como la interacción Fas-Fas (FasL), granzima-perforina, exocitosis de gránulos o la interacción con receptores de TNF (TRAIL:ligando DR4,5) o similares a TNF (TWEAK, ligando DR3) [76, 98, 99, 100]. La vía Fas-FasL parece predominar en la EICR hepática mientras que la de perforina/granzima es más importante en el tracto gastrointestinal y la piel. Las señales de peligro generadas en la fase 1 aumentadas por la expresión de moléculas coestimuladoras en la fase 2 inducen la producción de quimioquinas. La migración de los linfocitos T del

donante de los tejidos linfoides a los órganos diana es dirigida por estas quimioquinas y moléculas de adhesión como L-selectina e integrina α LB2. Los receptores de integrinas, que son regulados por quimioquinas, median muchas interacciones que son críticas para la adecuada migración de linfocitos T [98].

- Efectores inflamatorios: la secreción de citocinas inflamatorias como TNF α e IL-1 resulta en daño por EICR en órganos diana. La señal de secreción puede ser aportada a través de receptores toll-like (TLRs) por LPS y otros productos microbianos que se han filtrado a través de la mucosa intestinal debido al régimen de acondicionamiento. TNF α puede activar las CPAs y favorecer la presentación de aloantígenos, reclutar células efectoras a los órganos diana a través de la inducción de quimioquinas inflamatorias y causar directamente daño tisular vía apoptosis y necrosis. IL-1 está también implicada en la EICR aguda y su secreción ocurre predominantemente en el bazo y la piel [98].

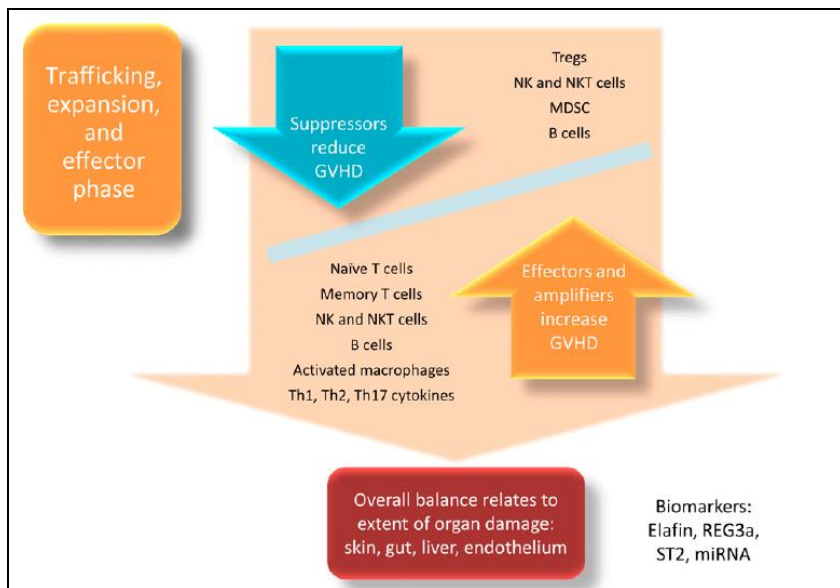


Figura 10. Fase efectora de la EICH [76]

2.1.2. Fisiopatología de la EICR crónica

La patogénesis de la EICR crónica no está tan bien establecida en la actualidad como en el caso de la EICR aguda. La EICR crónica es un desorden complejo que afecta a muchos órganos diferentes. Se caracteriza por disregulación inmune, inmunodeficiencia, daño en la funcionalidad de los órganos y descenso de la supervivencia. La persistencia de alorreactividad podría ser debida a la expansión de células T del donante que escapan a los mecanismos de depleción en el timo y en la sangre periférica, de forma que no desarrollan inmunotolerancia contra antígenos del receptor [101, 102]. Estos linfocitos podrían generar efecto citotóxico directo o producir citocinas que

inducirían la activación de células B y producción de autoanticuerpos, detectados en un 11-62% de los pacientes con EICR crónica, aunque la evidencia directa para esta relación causal de estos anticuerpos en la patogénesis de la EICR no ha sido aún demostrada, a excepción de los anticuerpos antiplaquetarios derivados del receptor del factor de crecimiento alfa en la EICR crónica de fenotipo esclerótico [103].

De forma general, los perfiles de riesgo son bastante similares tanto para EICR aguda como crónica [104]. En este contexto, la disparidad HLA es uno de los factores de riesgo más importantes para la EICR crónica, con una incidencia que varía entre un 40% para pacientes que reciben un alotrasplante de donante relacionado hasta un 70% en aquellos que lo reciben de donante no relacionado. Debido al fallo de los mecanismos reguladores (como consecuencia de la EICR aguda o su tratamiento y/o profilaxis), es posible que las células T del donante que reconocen epítomos de mi HAs puedan causar una EICR crónica a largo plazo.

No hay datos experimentales claros sobre el papel de las citoquinas proinflamatorias en la EICR crónica, aunque se observan niveles elevados de $\text{TNF } \alpha$ e $\text{IFN } \gamma$, que podrían predecir el inicio de EICR crónica extensa [105]. Algunos estudios sugieren que los polimorfismos en IL-10, IL-1 alfa, IL-1Ra e IL-6 muestran asociación con EICR crónica [106].

Además, el hecho de padecer EICR aguda grado 3-4 es el principal factor de riesgo para desarrollar EICRc, con un 70-80% de incidencia en pacientes que han desarrollado previamente EICRa. Sin embargo, se observan diferencias notables para otros factores de riesgo entre la EICR aguda y crónica, como el gran impacto que presenta el hecho de que el donante sea mujer y el receptor hombre en el desarrollo de EICRc comparado con la EICRa y la fuerte asociación con otros factores como la mayor edad del donante, el uso de células movilizadas de sangre periférica, así como la edad del donante que incrementa el riesgo de EICR crónica pero no de EICR aguda, lo cual sugiere que la EICR crónica no es sólo un estadio final de la EICR aguda [107, 108].

Los avances en el conocimiento sobre la fisiopatología de la EICR crónica no se han producido, en parte, debido a la ausencia de apropiados modelos experimentales. Aunque algunos modelos murinos reproducen ciertos rasgos de EICR crónica, tales como la fibrosis cutánea y pulmonar, la nefritis lúpica o el daño hepático [109], en contraste con dichos modelos, la cinética de la EICR crónica en humanos es más lenta. Incluso cuando la EICR crónica aparece "de novo" y en ausencia de una activa inmunosupresión, no es posible definir el impacto de la profilaxis de la EICR y de la EICR aguda subclínica en el desarrollo de la EICR crónica.

Existen numerosos estudios que indican que las células T del donante son un requisito absoluto para el desarrollo de EICR aguda y crónica. Las

linfocitos T CD4⁺ vírgenes, a través del contacto con su antígeno presentado por las APCs, se diferencian en Th1/Th2/Th17 o en células T reguladoras (Tr/Th3), dependiendo de las citoquinas presentes en el medio. Si bien las citoquinas Th1 (IFN gamma, IL-2 y TNF alfa) están implicadas en la fisiopatología de la EICR aguda, la producción de IL-2 por las células T del donante es la principal diana en algunas aproximaciones profilácticas y terapéuticas tanto en EICR aguda como crónica. Las células Treg secretan IL-10 o TGF- β (Th3). Algunos estudios han demostrado una fuerte asociación entre los polimorfismos de IL-10 y la severidad de la EICR [110]. En cuanto a la TGF-beta, una citoquina supresora, algunos estudios indican que atenúa la EICR aguda y exacerba la EICR crónica [111].

Varios estudios han demostrado un papel protector de las células Treg frente a la EICR [112]. En pacientes con EICR crónica, existe un número reducido de células Treg y deficiente expresión de Foxp3 en sangre periférica y en biopsias de mucosas [113-115]. Las células T aloreactivas vírgenes (CD62L⁺) se asocian con EICR aguda, no así las células T de memoria. La expresión del marcador CD62L propio de linfocito T virgen es juega un papel clave en el efecto inmunomodulador de los linfocitos T reguladores [116, 117].

Por otro lado, el daño tímico inducido por el tratamiento de acondicionamiento y la atrofia asociada a la edad, interrumpe el proceso fisiológico de maduración de los linfocitos T en el timo, lo que favorecería el

desarrollo de EICR crónica debido a la emergencia de células T autorreactivas dependientes del timo [118].

Así, podemos afirmar que, si bien las células T del donante maduras procedentes del aloinjerto son necesarias y suficientes para producir EICR aguda, en la inducción de la EICR crónica juegan un papel tanto éstas como las células T del donante generadas a partir de las células madre hematopoyéticas infundidas.

En cuanto a los linfocitos B, las evidencias clínicas y biológicas actuales muestran que la hemostasia desregulada de éstos está relacionada con el establecimiento de la fase crónica de la EICR, basándose esto fundamentalmente [119] en la presencia de anticuerpos frente antígenos de histocompatibilidad codificados en el cromosoma Y [120], niveles aumentados de células B con respuestas TLR9 alteradas [121], niveles incrementados del factor activador de células B (BAAF), que promueve la supervivencia y activación de células B en pacientes con EICR crónica [122] y niveles aumentados de autoanticuerpos en modelos animales [123]. Del mismo modo, la depleción^[124] de las células B durante el período de trasplante se ha correlacionado con una reducción en la incidencia de EICR crónica. Así, los pacientes con EICR crónica presentan un ratio incrementado de BAFF:linfocitos B, una reconstitución retrasada de linfocitos B naive y aumento de linfocitos B pregerminales.

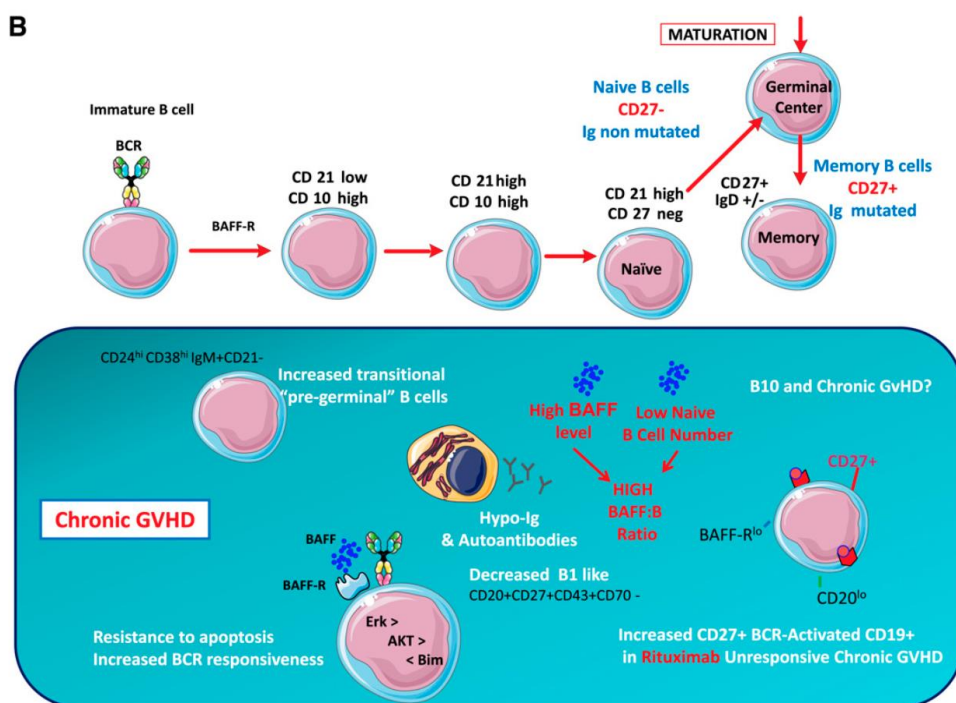


Figura 11. Patofisiología de la EICR crónica. Linfocitos B y EICR crónica [124]

Sin embargo, los mecanismos que promueven y sostienen la activación de linfocitos B en esta enfermedad siguen siendo sin estar claros [125]. Actualmente está en estudio el mecanismo de señalización del BAFF y del receptor de células B (B cell receptor BCR) en la EICR crónica. Las células B en la EICR crónica también presentan un aumento de las respuestas proliferativas a la estimulación por BCR, con elevaciones concurrentes en la proteína de unión de células B (PUCB) y en la fosforilación de SYK en

comparación con los pacientes sin EICR crónica [126]. Por otro lado, la inhibición de la actividad de la tirosina cinasa de Bruton (BTK) mediante ibrutinib bloquea la activación de PLC-gamma 2 en las células B de pacientes con EICR crónica, afectando a la supervivencia de las células B de pacientes con EICR crónica que dependen de la BTK [127]. Estos datos sugieren que el BAFF y el BCR se complementan para preparar la supervivencia y capacidad de respuesta frente a antígenos de las células B en pacientes con EICR crónica al bajar el umbral de la activación del RCB en la EICR crónica. Por lo tanto, las inhibiciones de SYK y BTK tienen^[127]_[SEP] el potencial de modular las funciones de las células B aberrantes en pacientes con EICR crónica.

2.2. Presentación clínica de la EICR

2.2.1. Clínica de la EICR aguda

La EICR aguda es una complicación frecuente y en ocasiones impredeciblemente severa del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos. A pesar de 5 décadas de estudios exhaustivos de laboratorio e investigación clínica para prevenir su aparición, esta complicación continúa siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad en los receptores de trasplante alogénico. Cada año, según datos del CIBMTR (Center for International Blood & Marrow Transplant Research), se trasplantan en torno a

6800 pacientes y, la mayoría sufren algunas manifestaciones de EICR aguda [76].

La forma aguda se definía clásicamente como aquella que tiene lugar dentro de los primeros 100 días tras el trasplante y se produce por el efecto citotóxico de los linfocitos del donante contra las células del receptor (células epiteliales de piel y mucosa, células de los conductos biliares, de las criptas en la mucosa intestinal o de la vía aérea) mientras que la EICR crónica es la que aparecía posteriormente [128-130]. La EICR hiperaguda, aunque infrecuente, es una forma grave que ocurre en la primera semana postinfusión y se caracteriza por fiebre, eritrodermia generalizada, descamación, hepatitis, inflamación y síndrome de capilaritis [131]. Sin embargo, el National Institute of Health describe una nueva entidad, la EICR aguda tardía, que se produce más allá del día más 100 con las características clínicas e histológicas de la EICR aguda [132].

Los principales órganos dianas de la EICR son: la piel (81% de los pacientes), el tracto gastrointestinal (54%) y el hígado (50%) [69].

a) Piel:

A menudo la primera manifestación de la EICR aguda es un rash pruriginoso, maculopapuloso, que aparece entre la segunda y la quinta semana post-infusión, generalmente coincidiendo con el injerto leucocitario; puede ser pruriginoso o doloroso y generalmente comienza con eritema en base del

cuello, orejas, hombros, palmas y plantas, recordando a una quemadura solar. La necrosis epidérmica es la forma más severa con formación de bullas y separación epidérmica similar a la que se observa en la epidermiolisis tóxica. La afectación cutánea se clasifica en 4 grados, según la severidad (Tabla 1). El diagnóstico diferencial de la EICR aguda cutánea incluye los efectos de la quimio ó radioterapia, alergia a fármacos e infecciones virales; el diagnóstico debe confirmarse histológicamente [133].

b) Hígado

La afectación hepática por EICR aguda es infrecuente en ausencia de afectación cutánea. Es característica la ictericia con incremento de bilirrubina conjugada y fosfatasa alcalina, reflejo del daño a nivel de los canalículos biliares. Suele observarse también un incremento de transaminasas, aunque pueden permanecer en niveles normales. El diagnóstico diferencial incluye: enfermedad veno-oclusiva hepática, infección (generalmente por virus), sepsis y toxicidad por fármacos como metotrexate (MTX), ciclosporina-A (CSA) y tacrolimus. Es infrecuente el fallo hepático debido únicamente a EICR aguda y así, la presencia de hipoalbuminemia debe hacer sospechar afectación del tubo digestivo o balance nitrogenado negativo más que insuficiencia hepática [133]. La biopsia solo será necesaria en aquellos casos en los que no haya manifestaciones de EICR en otros órganos aunque si ésta es necesaria, los cambios histológicos observados en los conductos biliares son característicos.

c) Intestinal

La afectación intestinal es habitualmente la más severa y difícil de tratar. Las manifestaciones clínicas incluyen: anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal de tipo cólico y en casos graves hemorragia e íleo. En cuanto a las características organolépticas de la deposición, ésta suele ser verdosa, pudiendo presentar mucosidad y células de descamación. El volumen de la deposición puede ser muy importante en los casos severos, siendo necesarios una terapia trasfusional, fluidoterapia y soporte nutricional adecuados [133]. El diagnóstico diferencial incluye: toxicidad gastrointestinal inducida por el régimen de acondicionamiento o infecciones víricas o bacterianas, por lo que es necesario realizar estudios microbiológicos seriados. Los hallazgos endoscópicos son variables y a menudo inespecíficos, desde la normalidad al edema y el despegamiento de la mucosa; las lesiones pueden ser más prominentes en el ciego, íleon y colon ascendente pero pueden afectar también al estómago, duodeno y recto. La biopsia es obligatoria para el establecer el diagnóstico definitivo de EICR aguda digestiva. Algunos pacientes presentan una variante de EICR digestiva con afectación predominantemente alta, caracterizada por anorexia, dispepsia, náuseas y vómitos, sin diarrea; estos pacientes suelen responder bien al tratamiento inmunosupresor aunque con frecuencia desarrollan EICR crónica [133].

d) Otros

Se han descrito síntomas oculares en pacientes con EICR aguda consistentes en fotofobia, conjuntivitis hemorrágica, formación de pseudomembranas y logoftalmos y esta manifestación se ha asociado a peor supervivencia [134].

También el tejido linfoide puede verse afectado y así se observa en los ganglios linfáticos una disminución de los centros germinales y anomalías en las poblaciones linfoides, como inversión del cociente CD4/CD8 [135] lo que aumenta el riesgo de desarrollar infecciones severas postrasplante.

El grado de afectación de los principales órganos (piel, hígado y tubo digestivo) se combina para dar lugar a un sistema de clasificación (tabla 2) que permite predecir la supervivencia de los pacientes. Una posible limitación de este sistema es la escasa concordancia entre médicos. A pesar de ello, la clasificación de Glucksberg continúa siendo la más empleada [136-140].

Tabla 2. Estadiaje y clasificación de la EICR aguda (clasificación de Glucksberg)

Organo	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Piel	Rash <25% SC	Rash 25-50% SC	Rash >50% SC	eritrodermia generalizada con bullas
Hígado	Bilirrubina 2-3mg/dL	Bilirrubina 3,1-6mg/dL	Bilirrubina 6,1/15mg/dL	Bilirrubina >15mg/dL
Intestino	Diarrea >500mL/día	Diarrea >1000mL/día	Diarrea >1500mL/día	Diarrea >2000mL/día Dolor abdominal Ileo parálítico

Grado total	Piel	Hígado	Intestino	ECOG
I Leve	1-2	0	0	0
II Moderado	1-3	1	1	0-1
III Severo multiorgánico	2-3	2-4	2-3	2-3
IV Peligro de muerte	2-4	2-4	2-4	3-4

2.2.2. EICR crónica

La EICR crónica es la principal causa de muerte tardía no relacionada con la recaída después del trasplante. Aunque las tasas de supervivencia han mejorado en los últimos años, más de un 70% de los pacientes que se realizan un trasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica procedente de un donante HLA idéntico desarrollarán EICR crónica y, en más del 50 % será extensa, lo cual constituye la complicación más importante después del trasplante [101, 102, 108, 141]. En realidad, se reconoce como la principal causa de muerte a largo plazo, y además afecta en gran medida a la calidad de vida tras el HCT [142, 143]. Los pacientes con EICR crónica requerirán tratamiento inmunosupresor prolongado después del trasplante durante una media de 2 años desde el diagnóstico del mismo; más de una tercera parte de los pacientes requerirán tratamiento inmunosupresor durante 4 años; y hasta un 10 % de los supervivientes seguirán requiriendo tratamiento inmunosupresor durante al menos 7 años [144-146]. Su presentación puede ser progresiva (EICR aguda activa que se transforma en EICR crónica), quiescente (EICR aguda que se resuelve completamente y posteriormente aparece la EICR crónica) o de novo.

La clasificación clásica de la EICR crónica distingue dos variantes: limitada (aquellos que no requieren tratamiento) o extensa (que requieren tratamiento inmunosupresor) (tabla 3) [147, 148].

Tabla 3. Clasificación de la EICR crónica

Subclínica	Clínicamente asintomático, confirmado por biopsia			
Limitada	Afección cutánea localizada		o Disfunción hepática	
Extensa	Afección cutánea generalizada		o Afección cutánea localizada y disfunción hepática	
	mas			
	Hepatitis crónica, necrosis o cirrosis confirmada por biopsia	Afección oftálmica (Prueba de Schimmer <5mm)	Afección de glándulas salivales o mucosa oral demostrado por biopsia	Afección de otro órgano diana (pulmón, riñón)

Desde el punto de vista histológico se definen 3 categorías: no EICR, posible y probable. En el primer caso no hay evidencia de EICR, en el segundo la hay pero existen otras posibles causas y en el tercero hay evidencia sin otra causa o diagnóstico competitivo.

La clasificación propuesta por el "National Institute of Health Consensus Development Project"(NIH) establece 3 grupos de pacientes en base a los órganos afectados y la severidad de su afectación. Si bien se recomienda tener una confirmación histológica, ésta no es obligatoria si el paciente presenta al menos un criterio “diagnóstico” [124, 132]. A cada órgano se le asigna una puntuación de 0 a 3 según el grado de severidad de la afectación, de manera que la EICR crónica se divide en:

EICR crónica leve:

1 ó 2 órganos afectados salvo pulmón con score = 1

EICR crónica moderada:

> 2 órganos afectados con score = 1 ó

1 órgano afectado en caso de que el score sea = 2 ó que la afectación sea pulmonar (con score 1)

EICR crónica severa:

Score = 3 independientemente del número de órganos afectados (o score = 2 a nivel pulmonar)

2.3. Profilaxis de la EICR**2.3.1. Profilaxis de la EICR aguda**

Teniendo en cuenta las distintas fases de la EICR, se pueden diseñar estrategias encaminadas a la prevención (actuando fundamentalmente sobre las fases 1 y 2) o el tratamiento (manipulando las fases 2 y 3) de la misma [98, 149]. El factor más importante para prevenir la EICR es la elección del donante más adecuado, teniendo en cuenta el grado de compatibilidad HLA, la edad y el sexo del donante, entre otros factores. En relación con el primero de ellos, la compatibilidad HLA, numerosos estudios han confirmado que, en el contexto del trasplante alogénico de donante no emparentado, la identidad en 8 antígenos (o alelos) A, B, C y DRB1 entre donante y receptor permite alcanzar unos resultados clínicos similares a los del trasplante de donante emparentado. Por cada disparidad en cada uno de estos 8 locus la supervivencia cae un 10%, si

bien esta diferencia únicamente se produce en pacientes en fase precoz de la enfermedad, mientras que en fases más avanzadas las diferencias son menores. El estudio de 10 (incluyendo DQB1) o 12 locus (DPB1) podría ser de utilidad en aquellas situaciones en las que existen varios donantes disponibles [150, 151].

Sin embargo, a pesar de la importancia de la disparidad HLA donante-receptor, aproximadamente el 40% de los pacientes que se someten a un trasplante hematopoyético HLA idéntico desarrollan EICR aguda debido a diferencias genéticas distintas al HLA, como son los mHA, entre los que destacan (HY, HA-3 expresados en todos los tejidos y que son dianas para ambas EICR y EICL, HA-1 y HA-2 expresados en células hematopoyéticas, incluidas las células leucémicas, por lo que pueden inducir un gran EICL y menor EICR [10, 69, 74, 152].

Dada la complejidad de la inmunopatofisiología de la EICR aguda, ideas de modelos experimentales e investigación clínica traslacional han permitido la identificación de una compleja red inmune de desencadenantes, sensores, mediadores y efectores de las reacciones relacionadas con la EICR aguda, así como actores tolerógenos que pueden mitigar el proceso.

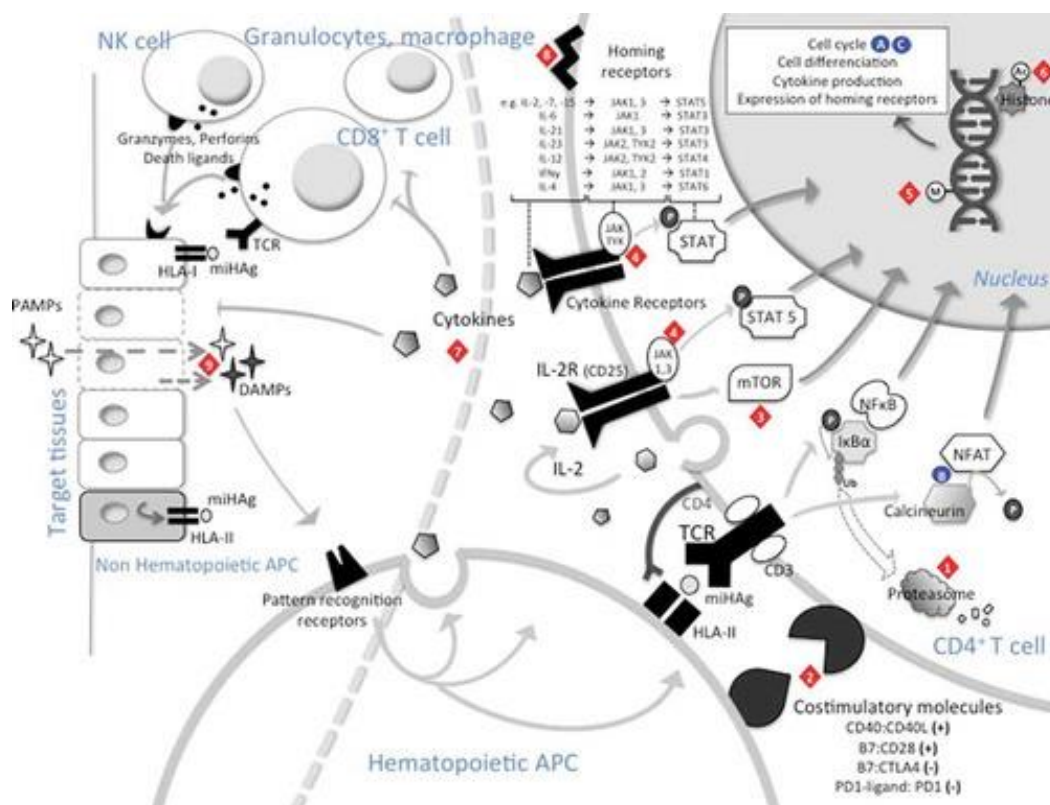


Figura 12. Dianas de terapias estándar y nuevas terapias para la prevención de EICR aguda [153]

2.3.1.1. Estrategias actuales de profilaxis de EICR aguda

2.3.1.1.1. Estrategias estándar: antimetabolitos e inhibidores de calcineurina

Desde 1980, la pauta estándar de profilaxis de EICR para pacientes sometidos a trasplante alogénico mieloablativo de hermano HLA idéntico o no emparentado ha consistido en la combinación de metotrexate (MTX, que

elimina linfocitos proliferantes) con un inhibidor de calcineurina (ciclosporina o tacrolimus) [154, 155].

El MTX, antagonista del ácido fólico, mediante el bloqueo de la enzima dihidrofolato reductasa, se administra 24 horas tras el fin de la infusión de los progenitores en los días +1, +3, +6 y +11 post-trasplante.

Ciclosporina

Es un polipéptido cíclico formado por 11 aminoácidos de aproximadamente 1,2 kDa de peso molecular, extraído del hongo *Tolypocladium inflatum* y que está disponible en clínica desde 1978. Se descubrió en 1973 y pronto se constataron sus propiedades antiparasitarias, antifúngicas y su efecto inmunosupresor. La capacidad inmunosupresora de la ciclosporina se basa en su unión a la proteína citosólica ciclofilina (una inmunofilina) de linfocitos inmunocompetentes, especialmente linfocitos T. Este complejo de ciclosporina y ciclofilina inhibe la calcineurina la cual, bajo circunstancias normales, es responsable de activar la transcripción de IL-2. También inhibe la transcripción de la producción de citocinas y la liberación de interleucinas y por lo tanto conduce a una reducción en la función de las células T-efectoras (linfocitos T efectores). Tiene también un efecto sobre las mitocondrias. La ciclosporina A inhibe la apertura del poro de transición de

permeabilidad mitocondrial, de esta forma, inhibe la liberación del citocromo c, un potente factor de estimulación de apoptosis.

En 1986, el grupo de Seattle publicó los primeros resultados en los que se mostraba la superioridad del uso combinado de MTX más ciclosporina frente a la ciclosporina sola como profilaxis de la EICR tras trasplante alogénico en leucemia mieloide crónica [156], pasando a ser el régimen convencional empleado por la mayoría de los centros trasplantadores hasta la actualidad.

Tacrolimus

Es un macrólido derivado del hongo *Streptomyces tsukubaensis* y potente inmunosupresor que, a nivel molecular, actúa mediante la unión a una proteína citosólica (*FK-binding protein 12*, FKBP12). El complejo FKBP12-FK-506 se une de forma específica y competitiva a la calcineurina, lo que produce una inhibición calcio-dependiente de las vías de transducción de señales en las células T.

Dos ensayos prospectivos randomizados multicéntricos que comparaban MTX/ciclosporina frente a MTX/tacrolimus se llevaron a cabo por Nash y col en pacientes con hemopatías malignas sometidos a trasplante de donante no emparentado y V. Ratanatharathorn y col donantes emparentados. A pesar de que ambos estudios describen una reducción en la incidencia global de la EICR

aguda (no de la crónica), la supervivencia de los pacientes tratados con MTX/tacrolimus no era mejor e incluso era ligeramente inferior en los pacientes que recibían trasplante de donante emparentado [157, 158].

Al bloquear la calcineurina, inhibe la vía de señalización dependiente de calcio de los linfocitos T y bloquea la producción de citoquinas (IL-2), la capacidad apoptótica y la degranulación de linfocitos T citotóxicos. La CaN se encarga de la desfosforilación de NFAT requerida para su traslocación al núcleo, donde forma un complejo con AP-1 para unirse al promotor de IL-2 Y también está implicada en la regulación de la actividad de I κ B, inhibidor de NF- κ B, que tras su fosforilación da lugar a la traslocación al núcleo de NF- κ B y la activación del linfocito T.

Sirolimus

El sirolimus o rapamicina, descubierta a partir de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* es una lactona macrocíclica con propiedades antifúngicas, antitumorales e inmunosupresoras [159-163]. El sirolimus inhibe la activación de las células T, mediante el bloqueo de la transducción de señales intracelulares dependientes e independientes de calcio. Su mecanismo de acción se basa en la unión del fármaco a las proteínas citosólicas FKBP12. El complejo sirolimus/FKBP12 inhibe la activación de la Molécula Diana de la Rapamicina en mamíferos (mTOR) (*mammalian target of rapamycin*), crítica para la

progresión del ciclo celular, debido a que forma parte de la vía de señalización celular PI3K/AKT [164-166].

mTOR, es una proteína quinasa serina/treonina implicada en la regulación del crecimiento, proliferación, motilidad y supervivencia celular así como la síntesis proteica y la transcripción celular [167-169]. mTOR pertenece a la ruta de señalización de PI3K/Akt/mTOR [170]. Receptores tirosina quinasa en respuesta a factores de crecimiento y citoquinas se fosforilan y dan lugar al reclutamiento de PI3K en la membrana. PI3K transfiere un grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂), generando fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) y ADP. En contrapartida PTEN ejerce un efecto antagonista a PI3K defosforilando PIP₃, de manera que actúa como regulador negativo de esta vía [170-172].

Otras funciones de Akt son inactivar proteínas con actividad apoptótica como BAD y caspasa 9 y actuar sobre la función de diversos factores de transcripción, entre ellos NF- κ B [173, 174]. Akt fosforila IKK, activándolo y este a su vez fosforila I κ B, lo cual permite la ubiquitinación y degradación por el proteosoma de I κ B.

Sirolimus bloquea la vía PI3K/Akt/mTOR, a través de la inhibición del TORC1, lo cual evitaría la activación de los linfocitos T convencionales al interferir en la vía señalización estimulada por la señal 2 [175, 176]. Por el contrario, en los linfocitos T reguladores la vía PI3K/AKT/mTOR se encuentra

inactiva debido a un mayor bloqueo por parte de PTEN [177] lo que confiere a los Treg cierta resistencia natural a la acción del sirolimus, como previamente se ha explicado. El sirolimus se ha empleado con éxito para la expansión *in vitro* de Treg e *in vivo* ha mostrado preservar el efecto supresor de los Treg [178-181].

En un ensayo clínico fase II llevado a cabo en el Dana Farber, se observó una excelente eficacia de la combinación de sirolimus con FK-506 en la que la incidencia de EICR agudo grado III-IV fue inferior al 5% en pacientes sometidos a TPH de sangre periférica de donante emparentado o no emparentado [182].

Recientemente se ha publicado sobre un total de 500 pacientes de un estudio multicéntrico a nivel nacional, que la combinación de rapamicina y tacrolimus incrementa de manera significativa la supervivencia hasta el 70% a 4 años, por lo que numerosos estudios están empleando esta combinación como grupo “control” frente al que comparar nuevas estrategias [183]. También el pasado año, fueron reportados los datos de un ensayo prospectivo randomizado de 139 pacientes comparando tacrolimus, sirolimus y metotrexate con los regímenes convencionales en adultos con linfomas que se someten a trasplante alogénico de intensidad reducida para establecer el posible beneficio de sirolimus en el pronóstico postrasplante. No observaron diferencias en términos de supervivencia global a 2 años, supervivencia libre de progresión, recaída,

mortalidad no relacionada con la recaída o EICR crónica. Sin embargo, interesantemente, se objetivó en el brazo de pacientes que recibían sirolimus una incidencia significativamente menor de EICR aguda grado II-IV (9% versus 25%, $p=0.015$) [184]

Micofenolato

El micofenolato mofetilo (MMF) es un potente inhibidor, no competitivo y reversible de la inosina monofosfato deshidrogenasa. Tiene la función de inhibir la síntesis *de novo* del nucleótido guanosina, bloqueando su incorporación al ADN y así inhibir la proliferación linfocitaria. El MMF ha mostrado actividad sinérgica con inhibidores de calcineurina para prevención de EICR aguda [185]. Se usa comúnmente en lugar de MTX en combinación con ciclosporina o tacrolimus para la profilaxis de EICR en trasplante de intensidad reducida [186, 187]. En el contexto del trasplante de cordón, la combinación de ciclosporina y MMF se asocia a una menor incidencia de EICR crónica que con ciclosporina y corticoides [188].

2.3.1.1.2. Estrategias de depleción T

Aunque las combinaciones de inhibidores de calcineurina con MTX o MMF han sido relativamente exitosos en la prevención de las formas más severas de EICR aguda, estos regímenes no son uniformemente efectivos y la

mayoría fallan en la prevención del desarrollo de EICR crónica moderada/severa, particularmente tras el trasplante alogénico de sangre periférica o de donante no emparentado [189, 190]. Esto ha conllevado la adición por distintos de anticuerpos frente a linfocitos T pretrasplante con idea de inducir una depleción in vivo de linfocitos T.

Timoglobulina

La timoglobulina (ATG) es un anticuerpo policlonal que se obtiene tras inmunización de conejos con timocitos. La adición de ATG a la profilaxis de EICR se ha evaluado en numerosos estudios prospectivos aleatorizados, siendo la conclusión común a todos ellos que permite reducir de manera significativa el riesgo de EICR aguda y sobre todo crónica, y, por tanto, con un impacto favorable en la calidad de vida postrasplante, pero sin incrementar la supervivencia a largo plazo e incluso con descenso de la misma en algún estudio en el contexto del trasplante de intensidad reducida [191, 192]. Varios estudios han reportado que ATG induce una depleción más profunda y prolongada en el compartimento de los linfocitos T naive [193, 194]. Tres ensayos randomizados fase III han reportado un menor riesgo de EICR aguda y crónica sin incremento del riesgo de recaída tras trasplante alogénico de intensidad reducida de donante relacionado o no de sangre periférica [191, 195, 196], si bien ninguno tiene un impacto significativo en la supervivencia.

En el ámbito del trasplante de intensidad reducida, el papel de ATG no se está del todo establecido, de hecho, en un estudio se encontró un mayor riesgo de recaída y mortalidad global en pacientes con ATG [187] mientras que otro estudio con pacientes con leucemia mieloide aguda sometidos a trasplante de hermano HLA idéntico de sangre periférica vieron una menor incidencia e EICR crónica pero similar riesgo de recaída y mortalidad [197].

Alentuzumab

Es un anticuerpo monoclonal anti-CD52, antígeno expresado por linfocitos T, B y células NK, que tiene propiedades depletoras de linfocitos T y B. La depleción in vivo con alentuzumab ha sido estudiado fundamentalmente en el trasplante de intensidad reducida [198, 199], así, su infusión pretrasplante ha demostrado ser muy eficiente en la prevención de la EICR aguda y crónica [192] pero, sin embargo, retraso de la reconstitución inmune, aumento de infecciones y mayor tasa de recaída.

2.3.1.2. Nuevas estrategias de profilaxis de EICR aguda

Inhibidores de proteosoma

El bortezomib (Bz), ácido N-pirazinacarbonil-L-fenilalanina-L-leucina-borónico, es el primer inhibidor del proteosoma empleado en clínica, aprobado en la actualidad para el

mieloma múltiple [200-202]. Se caracteriza por inhibir de forma selectiva y reversible el proteosoma 26S, interfiriendo en la vía ubiquitina-proteosoma.

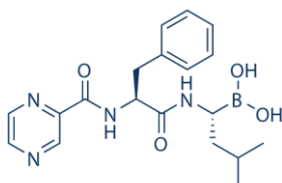


Figura 13. Estructura química bortezomib

El sistema ubiquitina-proteosoma controla funciones básicas tales como la progresión del ciclo celular, señal de transducción y la muerte celular programada. Es esencial en la degradación de proteínas intracelulares en las células eucariotas, por lo que está presente en todas las células eucariotas, tanto en el núcleo como en el citoplasma.

La forma más común de proteosoma, denominada 26S, tiene alrededor de 2.000 kilodalton (kDa) de masa molecular. Se trata de una proteasa multicatalítica dependiente de adenosina trifosfato (ATP) que presenta un núcleo 20S y dos subunidades reguladores 19S. Esta proteasa degrada tanto proteínas ubiquitinadas, dañadas, oxidadas o con plegamiento anormal como proteínas reguladoras que controlan el ciclo celular, la activación del factor de transcripción, la apoptosis y el intercambio celular [203]. Por lo tanto la

degradación proteosómica es un mecanismo esencial en el ciclo celular, expresión génica y en respuesta al estrés oxidativo.

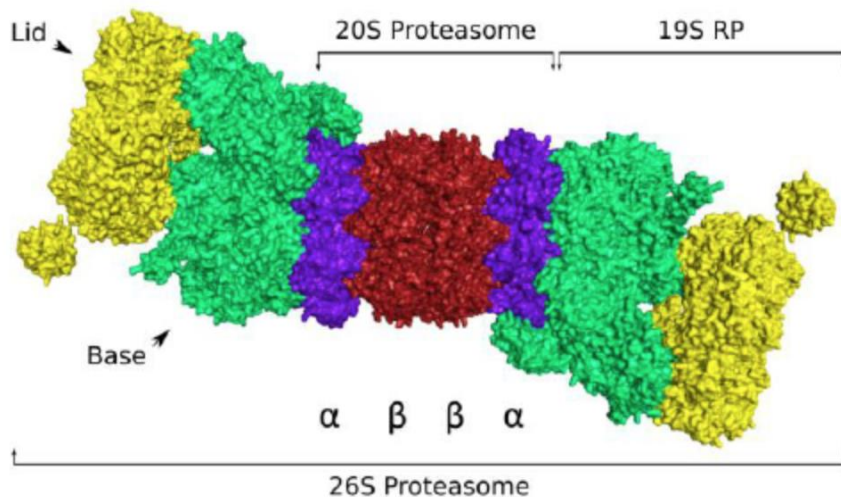


Figura 14. Estructura proteosoma

La partícula 20S es un cilindro compuesto de cuatro anillos apilados, cada uno de los cuales contiene siete subunidades α o β . Mientras que las subunidades α son fundamentalmente estructurales, las β se encargan de las funciones catalíticas. Presenta una cavidad cerrada donde las proteínas son degradadas. Las aberturas en los extremos del núcleo sirven de entrada a las proteínas. Las subunidades reguladoras 19S, situadas en los extremos, presentan múltiples sitios con actividad ATPasa y sitios de unión a ubiquitina, conformando así la estructura que se encarga tanto de reconocer a las proteínas

poliubiquitinadas, como de transferirlas al núcleo catalítico, estando por tanto involucradas en el reconocimiento, unión y despliegue de las proteínas ubiquitinadas y en la regulación de la apertura de la unidad central 20S.

La ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos que se expresa en todas las células eucariotas. A través de la coordinación secuencial de tres enzimas: E1 (enzima activadora de ubiquitina), E2 (enzima de conjugación de ubiquitina) y E3 (ubiquitina ligasa), la ubiquitina se activa y se une covalentemente a los posibles sustratos del proteosoma [201].

Mediante este sistema tiene lugar la degradación transitoria de diversas proteínas reguladoras durante el ciclo celular, imprescindible para que la célula progrese a lo largo del ciclo celular y entre en mitosis. Entre estas proteínas destaca el supresor tumoral p53, que actúa como regulador negativo del crecimiento celular. Del mismo modo, es necesaria para la regulación transcripcional.

NF- κ B es un factor clave de transcripción implicado en la regulación de la respuesta inmune; el proteosoma degrada el inhibidor de NF- κ B, I κ B y permite la traslocación al núcleo de NF κ B y su actividad transcripcional [204, 205].

NF κ B incluye varios factores de transcripción pertenecientes a la familia REL que se traslocan al núcleo desde el citoplasma en respuesta al estímulo

celular. NFkB se encarga de la regulación de las moléculas de adhesión celular (CAM) tales como la E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, del control antiapoptótico y de la regulación del ciclo celular. NF-kB está implicado tanto en la activación de los linfocitos T como en la maduración de las CDs [206-208]. Además LPS o CpG del DNA de virus y bacterias estimulan los TLR e inducen la maduración de las CDs a través de diversas vías que finalmente convergen en NF-kB [209, 210]. Al contrario que NFAT su activación es esencial para el papel inmunogénico de las células T pero no para una respuesta tolerogénica. Así, para que tenga lugar la activación del linfocito T convencional se debe producir la estimulación tanto del receptor TCR/CD3 como de moléculas coestimuladoras, de manera que las vías de señalización convergen en la activación de los factores de transcripción AP-1, NFAT y NFkB. Si inhibimos NF-kB la señal que llega al linfocito T está sólo mediada por el TCR/CD3 y por lo tanto se produce una respuesta anérgica en el linfocito.

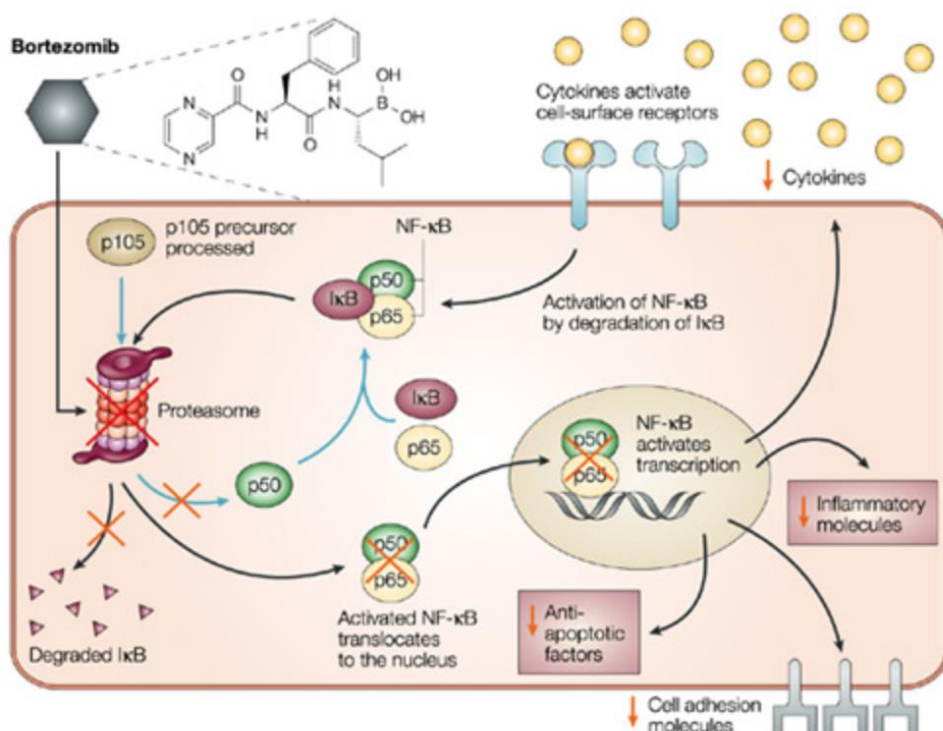


Figura 15. Ubiquitinación y degradación de IκB por el proteosoma [211]

El bortezomib impide la degradación de las proteínas ubiquinadas, entre ellas la del inhibidor de NFκB, IκB, inhibiendo de este modo la función de NF-κB y evitando la activación de todos los procesos celulares como la activación o la proliferación linfocitaria. En este sentido, Blanco y cols pusieron de manifiesto que el bortezomib *in vitro* induce un efecto apoptótico específico sobre linfocitos T alorreactivos, tras un cultivo mixto disminuyendo la producción de citoquinas Th1 [212], hallazgos que fueron confirmaron

simultáneamente en modelos animales por K. Sun y col. al mostrar cómo el bortezomib administrado en el periodo inmediato post-trasplante disminuía el riesgo de EICR aguda preservando el efecto injerto contra tumor [213, 214]. El bloqueo del proteosoma podría afectar también al quimiotactismo, secreción de citoquinas inflamatorias, funciones de las APCs y potenciar Treg [215].

Koreth et al evaluaron en un ensayo clínico fase I-II ciclos cortos de bortezomib (en días +1, +4 y +7 postrasplante) asociados a tacrolimus/MTX con resultados prometedores [216, 217]. La combinación con bortezomib y otros agentes como tacrolimus y rapamicina (#NCT00670423) o ciclofosfamida postrasplante (#NCT01860170), así como el uso de nuevos inhibidores de proteosoma como carfilzomib (#NCT01991301) están siendo actualmente evaluados.

En este sentido, Blanco *et al.* [218] observaron que los linfocitos Treg CD4+CD25+ eran resistentes al efecto proapoptótico de bortezomib y que cultivos de linfocitos CD4+ en presencia de bortezomib promovía la aparición de una población de linfocitos T reguladores que inhibía significativamente proliferación, la producción de IFN-gamma y la expresión de CD40L en los linfocitos T efectores estimulados.

Además, nuestro grupo evaluó el efecto de bortezomib, sirolimus o la combinación de ambos en la proliferación y activación de linfocitos T

estimulados in vitro, reportando el efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus en la prevención de la EICR mientras que mantenía el EICL [219].

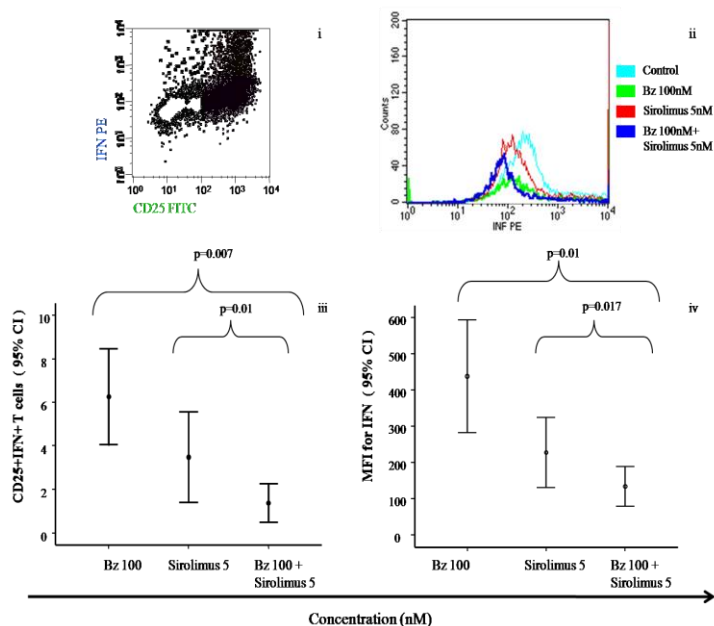


Figura 16. Inhibición sinérgica de la activación con bortezomib y sirolimus mediante la expresión de CD25 y la producción de IFN γ [219]

Ciclofosfamida postrasplante

La ciclofosfamida es una mostaza nitrogenada, agente alquilante, que elimina rápidamente células en proliferación. Su administración a altas dosis es un potente agente inmunomodulador que ha sido usado con éxito para la prevención de EICR. Dado que puede destruir específicamente linfocitos T alorreactivos respetando el resto de linfocitos T y células madre

hematopoyéticas. Estudios recientes sugieren que los linfocitos T reguladores son preservados bajo la exposición a ciclofosfamida, en parte debido a su alta expresión de aldehído deshidrogenasa [220]. Así, en el contexto del trasplante haploidéntico, se ha empleado (50mg/kg 1 ó 2 dosis, 48h después de la infusión) tras infusión en fresco de médula ósea sin manipulación previa *in vitro* en pacientes que reciben progenitores hematopoyéticos de donante haploidéntico. Habitualmente se administran otros inmunosupresores como tacrolimus y micofenolato tras la ciclofosfamida [221] y, en cuanto a los resultados descritos, si bien la incidencia de EICR es baja, la tasa de recaídas es muy elevada especialmente en pacientes con neoplasias avanzadas.

Teniendo en cuenta que la proliferación de los linfocitos aloreactivos y su activación ocurre alrededor de los días 2-4 postrasplante, esto es, en la fase 2 del desarrollo de la EICR, el grupo del John Hopkins University evaluó la administración postrasplante de ciclofosfamida a altas de dosis (50 mg/kg, los días +3 y +4) en combinación con tacrolimus/MMF (ambos iniciados después de la administración de ciclofosfamida) en pacientes sometidos a haploidéntico de médula ósea y régimen no mieloablativo, reportando una baja incidencia de EICR aguda grados III-IV [221, 222]. Un estudio reciente evaluó datos del CIBMTR en pacientes con LMA (Ciurea et al. 2015) que recibieron trasplante haploidéntico con ciclofosfamida postrasplante o trasplante no emparentado compatible. Mostraron una SG comparable entre

ambos regímenes de un 65% a 1 año. Los que se sometieron a haploidéntico, tenían menos EICR aguda y crónica, con grados II-IV de EICR aguda del 16% y crónica del 28% comparado con un 33% y 45% en los que recibieron un trasplante no emparentado. La MnRR era comparable entre ambos grupos pero la recaída fue mayor en el grupo de haploidéntico (41% vs 32%), siendo en la actualidad uno de los principales retos de este procedimiento.

Resultados similares (10% de EICR aguda grados III-IV) han sido observados por otros grupos incluyendo el grupo español de trasplante (GETH). Así, en el seno del GETH, analizaron retrospectivamente el pronóstico de pacientes con leucemia aguda mieloblástica sometidos a trasplante mieloablativo en las dos últimas décadas, usando como fuente cordón umbilical o donante haploidéntico con ciclofosfamida postrasplante. Observaron que la tasa de EICR aguda grados II-IV era significativamente mayor en el grupo de haploidéntico (9.8% vs 29%, $p=0.02$) así como de EICR crónica (20% vs 38%, $P=0.03$). Sin embargo, la supervivencia global a 2 años fue 55% vs 59% ($P=0.66$), supervivencia libre de evento 45% vs 56% ($p=0.46$), tasa de recaída de 27% vs 21% ($P=0.79$) y mortalidad no relacionada con la recaída de 17% vs 23% ($P=0.54$), respectivamente [223]. En la actualidad se está llevando a cabo un ensayo clínico fase 3 comparando ciclofosfamida postrasplante con tacrolimus/MTX y con una selección de CD34+ para la prevención de EICR

aguda en trasplante alogénico relacionado de médula o sangre periférica (#NCT02345850).

Esta elevada eficacia a la hora de inducir una depleción selectiva de linfocitos alorreactivos podría relacionarse con un mayor riesgo de recaída, especialmente en pacientes de alto riesgo que se someten a trasplante haploidéntico, en los que la tasa de recaídas alcanza el 50% (frente a un 16% en pacientes que se trasplantan en remisión). En este sentido, la eficacia de la infusión de linfocitos del donante está siendo testada por diversos grupos con idea de identificar la dosis ideal con la menor toxicidad posible [224].

Moduladores epigenéticos

Una vez se producen las señales de activación, el linfocito genera una respuesta Th1, Th2, Th17 o tolerogénica en función de la naturaleza del estímulo o de las citosinas presentes en el medio. La polarización en una dirección u otra está regulada por genes cuya expresión se regula a nivel epigenético. Estudios previos de nuestro grupo en modelos murinos han demostrado que agentes demetilante como 5-azacitidina o decitabina previenen la aparición de EICR aguda al inhibir la proliferación de Tconvs e inducción de T reguladores (a través de la demetilación de FoxP3) [225].

En base a este mismo concepto, los inhibidores de histona deacetilasa, como el vorinostat, serían también capaces de promover la expansión

postrasplante de Treg disminuyendo el riesgo de EICR, como se ha podido confirmar recientemente en un ensayo clínico en el que el riesgo de EICR grados 2-4 fue del 22% en 50 pacientes que recibían vorinostat más tacrolimus y MMF [226].

Otros

Todo este proceso de activación y proliferación linfocitaria depende, como se ha mencionado, de la activación de diversas vías de señalización. Para ello es necesaria la unión de enzimas y moléculas que inician estas cascadas de señalización a la membrana celular, en concreto, a fosfolípidos de membrana. Este anclaje a la membrana se produce mediante la unión de moléculas hidrofóbicas a las proteínas, proceso llamado *prenilación*, mediante el que se pueden unir grupos farnesilo (farnesilación) o geranil-geranilo (geranilación). Los inhibidores de este proceso podrían disminuir el riesgo de EICR [227]. Las estatinas actúan precisamente inhibiendo la producción de algunos sustratos implicados en la síntesis de grupos farnesilo o geranilo. Algunos estudios han demostrado, tanto en modelos animales como en la clínica, su impacto favorable en el riesgo de EICR [228].

Se ha mencionado que el entorno en el que se produce la activación linfocitaria juega un papel clave en el tipo de respuesta inmune que finalmente se genera. En este sentido, la IL-6 tiene un papel importante en el desarrollo de la

EICR. Recientemente, Kennedy *et al.* describieron cómo la administración postrasplante de anti-IL6 disminuye el riesgo de EICR grados 2-4 del 39% en un grupo control al 11% en 50 pacientes que recibían el AcMo [229].

2.3.2. Profilaxis de la EICR crónica

Aunque la prevención de la EICR aguda ha mejorado en las tres pasadas décadas, no existe en la actualidad un régimen efectivo de profilaxis de EICR crónica. Únicamente el uso de ATG ha influido favorablemente en la incidencia de EICR crónica en estudios prospectivos randomizados. Es el manejo de la EICR crónica guiado por un equipo multidisciplinar así como tratamientos inmunosupresores y de soporte los que permiten evitar la aparición de complicaciones mayores en pacientes de alto riesgo [80].

La EICR crónica aparece a una media de 6 a 9 meses postrasplante y más de la mitad de estos pacientes no habrán desarrollado EICR aguda previa, lo cual indica que existen otros mecanismos diferidos de respuesta inmune implicados en el desarrollo de la EICR crónica y que, consecuentemente, sería razonable plantear el desarrollo de estrategias de inmunomodulación en fases más tardías del trasplante, y no solamente en las fases más precoces, como ocurre con todas las estrategias empleadas en la actualidad.

En este sentido, conocido el papel de los linfocitos B en la patogénesis de la EICR crónica, constituye una estrategia a explorar en la profilaxis de

EICR crónica. Se ha valorado la administración de rituximab, agente que depleciona linfocitos B, antes y después del trasplante en el contexto de diversos ensayos clínicos en la actualidad (#NCT01044745, #NCT01810926). Es más, un estudio abierto con rituximab evaluó el potencial de tratamiento profiláctico para el desarrollo de EICR crónica en el periodo posterior al trasplante. Este estudio demostró clínicamente la existencia^[11]_{SEP} de diferencias relevantes en la incidencia acumulativa de EICR crónica y en su supervivencia total [230].

Por otro lado, teniendo en cuenta que las inhibiciones de SYK y BTK tienen^[11]_{SEP} el potencial de modular las funciones de las células B aberrantes en pacientes con EICR crónica, fármacos como entospletinib e ibrutinib constituyen una opción prometedora en el campo de la profilaxis de EICR crónica.

Alodepleción

La alodepleción *in vitro*, cuya finalidad es evitar la apoptosis de linfocitos potencialmente citotóxicos frente a células tumorales, tiene en la actualidad un papel relevante con vistas a minimizar la aparición tanto de EICR aguda como crónica. En este escenario, destacar el ensayo multicéntrico fase II, basado en la administración de ATIR101, producto de linfocitos T alodeplecionado de células alorreactivas mediante el uso de un tratamiento

fotodinámico (un análogo de la rodamina) en pacientes con hemopatías malignas sometidas a trasplante haploidéntico con selección de CD34. Se administran dos dosis de ATIR101 de 2×10^6 linfocitos T/kg cada una entre los días 28-32 y nuevamente entre el 70-74 postrasplante.

En relación con la depleción *ex vivo*, aunque estudios iniciales sugirieron que su efecto beneficioso se veía contrarrestado por alta tasa de fallo de injertos, recaída e infecciones [231], 2 ensayos multicéntricos prospectivos fase II utilizando sangre periférica como fuente de progenitores y técnicas de depleción T, como selección positiva inmunomagnética de CD34 *ex vivo* han sugerido que esta estrategia previene eficazmente la EICR sin incrementar aparentemente el riesgo de recaída [232, 233]. La infusión de megadosis de CD34 purificadas ha sido la base de estrategias de trasplante haploidéntico con depleción T [234, 235]. Sin embargo, estudios randomizados con un mayor número de pacientes son necesarios sobre todo para valorar el impacto de la depleción T en la incidencia de recaída.

3. ALODEPLECIÓN

A pesar de los esfuerzos de numerosos grupos de investigación a nivel mundial durante muchos años, en la actualidad aún no se ha podido desarrollar ningún procedimiento que permita separar el EICL de la EICR de manera que,

en la práctica, los procedimientos más eficaces en la prevención de la EICR, como la depleción de linfocitos T del donante, provocan también una inmunosupresión más profunda y, por tanto, un mayor riesgo de recaída (menor EICL) o de infecciones potencialmente fatales en el período postrasplante [236].

Por tanto, es fundamental el desarrollo de nuevas estrategias que prevengan la EICR sin eliminar el EICL ni la respuesta inmune frente a patógenos que, tras la EICR, constituyen la segunda causa de mortalidad tras el trasplante.

Así, frente a la depleción inespecífica de linfocitos T, sería deseable disponer de estrategias de profilaxis cuyo mecanismo de acción sea mucho más selectivo, eliminando únicamente linfocitos activados o en proceso de mitosis, que serían los responsables de la EICR en fases tempranas del período postrasplante inmediato.

En el estudio publicado por Blanco y cols describieron cómo bortezomib es capaz de provocar un efecto proapoptótico muy selectivo frente a linfocitos alorreactivos, preservando la viabilidad de los linfocitos en reposo y manteniendo por tanto la respuesta inmune frente a patógenos o, potencialmente, frente a la leucemia/tumor [212].

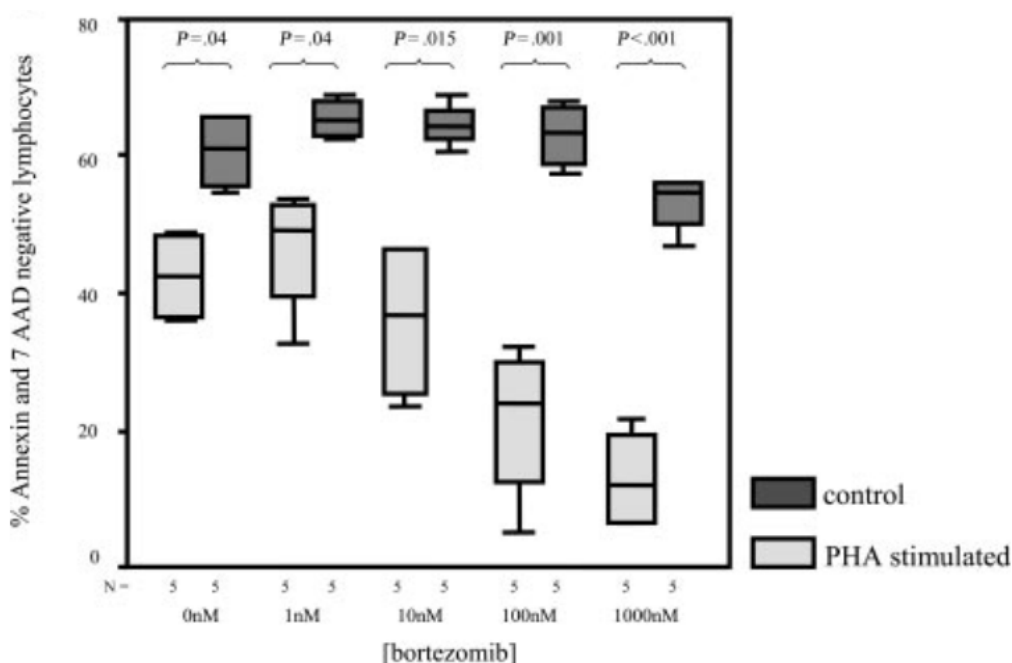


Figura 17. Viabilidad celular medida por citometría de flujo mediante marcaje con anexina V y 7AAD. Comparación del porcentaje de células CD3 negativas para anexina V y 7 AAD entre linfocitos T estimulados y no estimulados (control) a distintas dosis de bortezomib [212].

Esto se basa en el hecho de que en el proceso de activación linfocitaria intervienen vías de señalización como MAP cinasas, Akt-mTOR, p38, etc., que finalmente convergen en algunos factores de transcripción como Nf-kB, que convierten al linfocito T activado, y no al linfocito en reposo, en diana del efecto citotóxico de este fármaco. Así mismo, demostraron que, tras incubación *in vitro* de linfocitos del donante y células mononucleadas del receptor, bortezomib era capaz de producir una apoptosis y depleción selectiva de

linfocitos T alorreactivos, responsables de la enfermedad injerto contra huésped, manteniendo la reactividad linfocitaria frente otros antígenos expresados, por ejemplo, en patógenos como el CMV. En este sentido, en ausencia de péptido pp65 de CMV en el cultivo mixto primario comprobamos cómo, en un cultivo secundario, los linfocitos alodeplecionados mantienen la reactividad frente a CMV mientras que se pierde la reactividad frente a las células presentes en el cultivo primario y al contrario, cómo la presencia de pp65 /CMV en el cultivo primario elimina la respuesta anti-CMV en el cultivo secundario [237].

Estos hallazgos fueron también confirmados por otros grupos tanto en modelos *in vitro* [238] como en modelos animales [239, 240] en los que se ha podido confirmar que la depleción *in vitro* disminuye el riesgo de EICR sin eliminar el efecto antitumoral del trasplante y han sido la base para el desarrollo de diversos ensayos clínicos en los que se ha confirmado cómo el uso de bortezomib peritrasplante disminuye el riesgo de EICH incluso en pacientes sometidos a trasplante de donante no emparentado con alguna disparidad HLA, según comunica el grupo del Dana-Farber, Boston [241]. Sin embargo, esta propiedad del bortezomib, cuando se emplea *in vivo* en el peri-trasplante, puede conducir a una pérdida de clonas linfocitarias reactivas frente a virus, si se están replicando durante la exposición al fármaco, o frente a células tumorales, si éstas están presentes en el momento de la administración del mismo [238, 239].

Más aún, la combinación de bortezomib y rapamicina tiene un potente efecto sinérgico, potenciando la citotoxicidad sobre los linfocitos activados, como hemos podido comprobar *in vitro* y en modelos animales [219], y actualmente la combinación tacrolimus y rapamicina más bortezomib se está evaluando en diversos estudios prospectivos. Es importante señalar que esta alodeplección podría potencialmente generarse *in vitro*, empleando para ello bortezomib u otros procedimientos, como puede ser el uso de fotodeplección [242], que se están también evaluando en la actualidad en el contexto del trasplante de donante no emparentado o haploidéntico.

En este escenario, tal y como fue comentado previamente, destaca la ciclofosfamida, capaz también de generar un efecto citotóxico selectivo sobre los linfocitos que se encuentran en fase de división celular, preservando la viabilidad del resto de poblaciones. Su eficacia ha permitido incluso la realización de trasplantes haploidénticos con una tasa de EICR similar a la de trasplantes con un mayor grado de identidad HLA [243, 244].

Otros grupos de investigación han desarrollado procedimientos similares para generar una alodeplección selectiva *in vitro* y alguno de estos procedimientos ya se ha evaluado en la clínica. En este sentido, Solomon et al [245] publicaron un ensayo clínico en una serie de 16 pacientes que reciben linfocitos alodepleccionados *in vitro*. En este caso emplearon un anticuerpo antiCD25 unido a una inmunotoxina para eliminar selectivamente los linfocitos

que expresan el marcador de activación CD25 tras cultivo mixto. No obstante, en este ensayo la incidencia de EICR no fue inferior a la esperada, lo que pudo atribuirse al hecho de que CD25 también se expresa en los linfocitos T reguladores que juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis también tras el trasplante. También el grupo del Dana Farber [246] describió los resultados de un ensayo clínico sobre 24 pacientes que reciben linfocitos del donante a los que se induce *in vitro* anergia específica frente al receptor. En esta serie el 95% de los pacientes injerta y a pesar de recibir una dosis media de 29×10^6 linfocitos T / kg sólo 5 de los 21 pacientes evaluables desarrolla EICR, constatándose una recuperación de la respuesta inmune frente a CMV en relación con la infusión linfocitaria. Estudios similares han sido desarrollados por otros grupos con la misma intención aunque diferentes procedimientos como son el uso de anticuerpos antiCD137 [247] o la fotodeplección *in vitro*. En relación a este último procedimiento, Perruccio K y colaboradores [248] describieron que tras un cultivo mixto de linfocitos, los linfocitos activados (alorreactivos) no son capaces de expulsar fuera del citoplasma 4,5 dibromorodamina, compuesto tóxico para la célula cuando se expone a luz visible de 500 nm (Theralux), lo que les permite también una alodeplección selectiva. Este grupo presentó datos preliminares empleando este procedimiento en pacientes sometidos a trasplante haploide. Infundían dosis escalantes de linfocitos T alodepleccionados de $1,25 \times 10^5$ LT / kg, $2,5 \times 10^5$ /Kg, 5×10^5 /Kg, 1

x $10^6/\text{Kg}$ y $1.25 \times 10^6/\text{Kg}$, hasta un total de 23 pacientes. Únicamente 1 de los 8 pacientes que recibió $1 \times 10^6 / \text{kg}$ desarrolló EICR. Ninguno de los 4 que recibió $1.25 \times 10^6 / \text{kg}$ lo desarrolló. La infusión de $<5 \times 10^5/\text{Kg}$ linfocitos T permitió la aparición de linfocitos T específicos frente a patógenos en proporciones normales [248]. Posteriormente, un trabajo del grupo de Perruccio demostró que los análisis de dilución límite es un método fiable y sensible para medir la alorreactividad así como la frecuencia de linfocitos T específicos frente a patógeno y leucemia [249].

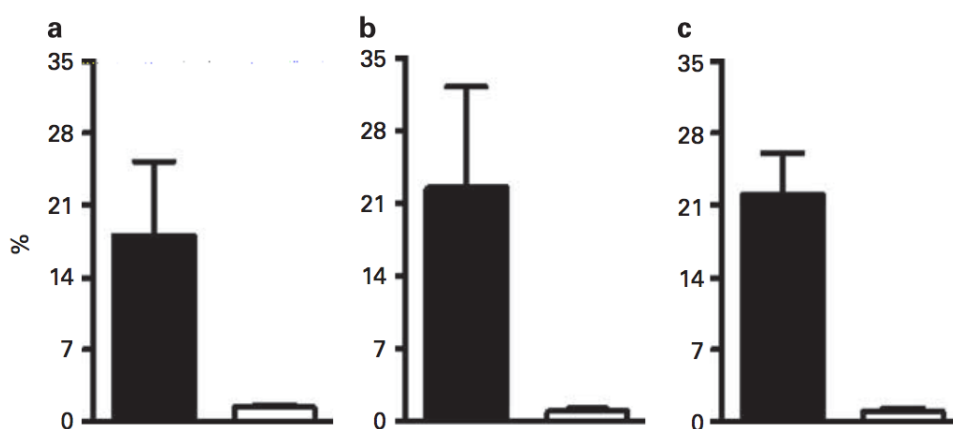


Figura 18. Comparación de linfocitos alorreactivos antes y después de tratamiento por análisis de dilución límite y citometría de flujo. El análisis de dilución límite es más sensible que la citometría de flujo [249].

De manera similar, J Daniels *et al.* [250], de Boston, describieron su experiencia en una serie de 24 pacientes sometidos a trasplante haploidéntico que reciben como profilaxis CsA y MTX a los que infunden “alloanergized T

cells”. La incidencia de EICR aguda fue del 38%, significativamente baja si tenemos en cuenta que únicamente emplearon CsA y MTX como profilaxis de EICR. Para obtener linfocitos anérgicos frente a los aloantígenos del receptor realizaron también un cultivo mixto de CMN del paciente y del donante en presencia de antiB7.1 y antiB7.2 durante 36 horas.

En ensayo basado en la administración de ATIR101, comentado previamente, evaluó la transferencia postrasplante de linfocitos T del donante deplecionados selectivamente de aquéllos reactivos frente a células del receptor usando este método de terapia fotodinámica en el contexto del trasplante haploidéntico (ClinicalTrials.gov#NCT01794299), con resultados preliminares presentados en el congreso de la Sociedad Americana de Hematología en 2015 y sugerían que este método era seguro y se asociaba a una muy baja incidencia de EICH aguda (ningún paciente de los 23 reportados experimentó EICH aguda grados III-IV) [251]. En la actualidad, va a emprenderse un fase III con el objetivo de comparar este esquema con el de ciclosfosfamida postrasplante también en el contexto del trasplante haploidéntico.

Por otro lado, en cuanto a la depleción de subtipos de linfocitos T, basándose en la observación en modelos murinos de que la depleción de CD8 del injerto podría prevenir la EICH aguda, Nimer y cols llevaron a cabo una depleción de CD8 del injerto como método de prevención de EICH aguda sin incremento de infecciones o comprometer el EICL [252]. En un estudio

randomizado que incluía 38 pacientes, la depleción de CD8 de médula de donantes hermanos HLA idénticos previno eficazmente la incidencia de EICH aguda grados II-IV (20% versus 80% $P = 0.004$). Desafortunadamente, estos hallazgos no fueron confirmados en otro fase II randomizado que se llevó a cabo en pacientes a los que se les administró progenitores de sangre periférica de donantes donantes relacionados y no relacionados tras acondicionamiento no mieloablatoivo [253].

Intentos de mejorar la reconstitución inmune así como el EICL tras un trasplante con depleción T, llevaron a Airoidi y cols [254] al desarrollo de un método de depleción T que consistía en la eliminación de linfocitos T $\alpha\beta^+$ y la conservación de linfocitos T TCR $\gamma\delta^+$ y células NK del donante en el injerto. Demostraron que prevenía eficazmente la EICH aguda tras trasplante haploidentico sin necesidad de otras profilaxis farmacológicas postrasplante [255].

Otros grupos han estudiado *ex vivo* que la depleción del injerto de linfocitos T naive limita la aparición de EICH aguda, basándose en la depleción inmunomagnética de CD45RA+. Esta estrategia fue llevada a cabo en un estudio piloto en el contexto del trasplante mieloablatoivo usando progenitores de sangre periférica [256]. Sin embargo, no se observó reducción en la incidencia de EICH aguda comparado con la cohorte de controles histórica pero, la incidencia de EICH crónica fue muy baja (9% versus 50%). Esta

estrategia está siendo evaluada en la actualidad en un ensayo clínico fase II (ClinicalTrials.gov#NCT02220985).

En resumen, algunos grupos de investigación a nivel internacional están avanzando en el desarrollo de nuevos procedimientos para la profilaxis de EICH especialmente en el contexto del trasplante alogénico de donante no emparentado o haploidéntico. Si bien se han descrito varios métodos, actualmente en fase experimental, todos se basan en la posibilidad de eliminar selectivamente linfocitos aloreactivos manteniendo viables en resto de poblaciones linfocitarias. Sin embargo, estudios randomizados con un mayor número de pacientes son necesarios especialmente para valorar el impacto de la depleción T en la incidencia de recaída.

4. MIELOMA MÚLTIPLE Y TRASPLANTE ALOGÉNICO

El uso de nuevos fármacos ha cambiado dramáticamente la evolución de los pacientes con mieloma múltiple. Entre los pacientes recién diagnosticados, la media de supervivencia ha mejorado en los últimos años alcanzando los 50 meses en pacientes diagnosticados desde el 2001 [257]. La mejoría en el pronóstico no sólo se ha evidenciado en pacientes de nuevo diagnóstico, sino también en pacientes en recaída. En este sentido, la mediana de supervivencia tras la recaída se ha incrementado de 11,8 meses antes del año 2000 a 24 meses

tras esa fecha.

Debido a los avances en el conocimiento de la biología del MM, se han reportado resultados prometedores con nuevos fármacos como son inhibidores de las deacetilasas de histonas, nuevos inhibidores del proteasoma, nuevos IMiDs, pequeñas moléculas inhibidoras de vías de señalización intracelular (p38, PI3K/Akt/MTOR, IKK β), antagonistas de receptores de superficie y antígenos (FGFR3, TRAIL, CS1, IL-6), inhibidores de ciclinas/quinasas dependientes de ciclinas, inhibidores del plegamiento anómalo de proteínas e inhibidores de los mediadores de la enfermedad ósea mielomatosa (RANK ligando - denosumab, DKK1).

Así, destaca el ensayo clínico fase III ASPIRE (n=792) en el que demostraron que mejoraba significativamente la supervivencia libre de progresión (SLP) con carfilzomib, lenalidomida y dexametasona comparado con lenalidomida y dexametasona en pacientes con MM en recaída, alcanzando en el subgrupo de alto riesgo citogenético SLP de hasta 23.1 meses [258].

También destacar fármacos como pomalidomida, indicada en pacientes con mieloma múltiple resistente al tratamiento o recidivante que hayan recibido al menos dos tratamientos previos, incluyendo lenalidomida y bortezomib, y que hayan experimentado una progresión de la enfermedad en el último tratamiento, en cuyo ensayo pivotal se aleatorizaron 455 pacientes y se demostró un incremento de la supervivencia global en el grupo de

pomalidomida más bajas dosis de dexametasona, con una diferencia de medianas de supervivencia de 4.6 meses [259-261].

Por otro lado, la incorporación de fármacos como ixazomib, inhibidor del proteosoma oral, del que existen ensayos con resultados prometedores como el de Moreau *et al.*, en el que la administración de ixazomib, lenalidomida y dexametasona es el primer triplete de administración oral que combina un inhibidor del proteasoma con un IMiDs en el tratamiento de los pacientes con MM en recaída después de al menos una línea de tratamiento previo [262].

Por otro lado, daratumumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD38, está indicado actualmente para el tratamiento de pacientes en recaída y refractarios al tratamiento que hayan recibido previamente un inhibidor del proteasoma y un agente inmunomodulador y que hayan presentado progresión en el último tratamiento [263-265]. Existen estudios comparativos con este fármaco muy relevantes como el reportado por Dimopoulos *et al* [266], fase I en el que se randomizaron 569 pacientes con MM que habían recibido lenalidomida y dexametasona solo (grupo control) o en combinación con daratumumab. Evidenciaron una SLP a los 12 meses de 83.2% (95% CI, 78.3 to 87.2) en el grupo de daratumumab comparado con un 60.1% (95% CI, 54.0 a 65.7) en el grupo control. Además, observaron una tasa de respuestas globales significativamente mayores en el grupo de daratumumab (92.9% vs. 76.4%, $P<0.001$) así como de remisiones completas (43.1% vs. 19.2%, $P<0.001$).

Sin embargo, el trasplante alogénico representa la única opción con potencial curativo en el MM, recomendándose solo en pacientes en recaída con factores pronósticos de alto riesgo, y dentro de ensayos clínicos adecuadamente diseñados que evalúen el papel de los nuevos fármacos incorporados en los brazos de TASP y alotrasplante, investiguen procedimientos de inmunoterapia para prevención de la EICR (vacunas, terapia adoptiva con linfocitos T, terapia con células NK), y evalúen el tipo de acondicionamiento (mieloablatoivo vs intensidad reducida) [267].

Diversos estudios prospectivos randomizados llevados a cabo comparando trasplante autólogo versus alogénico muestran resultados contradictorios. Así, Kharfan-Dabaj *et al.* [268] compararon en un metanálisis autólogo en tándem vs autólogo seguido de alogénico en pacientes con mieloma de nuevo diagnóstico y mostraron que, a pesar de una mayor tasa de remisiones completas con el alogénico, la supervivencia era similar en ambos grupos debido a una mortalidad relacionada con el procedimiento mayor en el grupo de autólogo-alogénico.

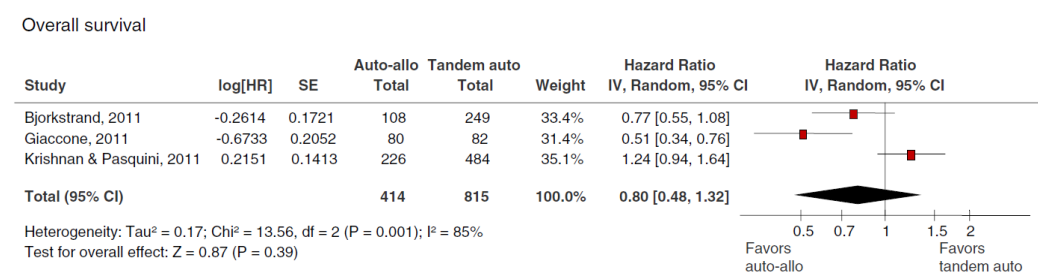


Figura 19. SG autólogo-alogénico vs autólogo en tándem [268]

Sin embargo, las limitaciones más importantes de todos estos estudios es que en ninguno de ellos se lleva a cabo una estratificación de los pacientes en función de factores pronósticos y, más importante, en ninguno de estos estudios se emplean nuevos fármacos.

Garhton *et al.*, en un estudio prospectivo EBMT-NMAM2000 compararon el trasplante en tándem autólogo seguido de alogénico con régimen de intensidad reducida (RIC) con autólogo simple o doble autólogo en 357 pacientes con MM de nuevo diagnóstico, obteniendo una SLP y SG de 22% vs 12% ($p=.027$) y 49% vs 36% ($p 0,03$).

Son varios los estudios prospectivos randomizados que evalúan el papel del trasplante alogénico en primera línea [269]. Sin embargo, la no inclusión de nuevos fármacos en el grupo control hace que en la actualidad tengan escaso impacto en la clínica actual.

Por otro lado, es importante destacar el efecto del trasplante alogénico dependiendo de la citogenética. En un estudio de Kroger *et al.*, vieron que tras una mediana de seguimiento de 6 años, la SLP a 5 años fue de 29% sin evidenciarse diferencias significativas entre pacientes con del 17p13/t(4;14 y otras (24% vs 30%,; $p=0.7$) [270]. Del mismo modo, Sonneveld en nombre del IMWG reportó un consenso sobre el tratamiento de mieloma múltiple con citogenética de alto riesgo que, en lo que a trasplante se refiere, indicaba que éste aumentaría la supervivencia libre de progresión en aquellos pacientes con t(4;14) y/o del(17p) [271].

No obstante, vale la pena mencionar que cuanto mayor es el número de tratamientos previos, peores son las expectativas reales de curación a largo plazo tras trasplante [272]. Por tanto, aunque es razonable retrasar el trasplante alogénico tras la primera recaída, considerando los buenos resultados obtenidos en pacientes recientemente diagnosticados con nuevos fármacos y considerando también la morbilidad del trasplante, es importante identificar aquellos pacientes que pueden ser candidatos a recibir trasplante alogénico a fin de someterse a este procedimiento de forma temprana, probablemente después de la primera recaída.

Kröger *et al.*, en un ensayo clínico prospectivo y multicéntrico, describen el papel del trasplante alogénico de donante no emparentado en 49 pacientes que habían recaído tras un trasplante autólogo previo mostrando una

tasa de respuesta global del 95%, incluyendo un 46% de remisiones completas, con una NRM a 1 año significativamente mayor en aquéllos con disparidades HLA (10% vs. 53%, $p=0.001$). La SLP a 5 años y la SG fueron del 20% y 26% respectivamente, y fueron significativamente mejores en los pacientes que alcanzaron remisión completa postrasplante (41% frente al 7%, $p = 0,04$, y 56% vs. 16%, $p = 0,02$) [273]. En una conferencia consenso sobre trasplante alogénico de rescate en pacientes con mieloma en recaída, Giralt y colaboradores indicaron que el trasplante sería adecuado realizarlo en aquéllos con recaída precoz (menos de 24 meses) tras primera línea de tratamiento que incluyera trasplante autólogo y/o con características de alto riesgo (citogenética, afectación extramedular, leucemia de células plasmáticas o LDH elevada). También este año se han publicado las recomendaciones del IMWG para pacientes con mieloma en recaída [274].

Debido a la alta mortalidad del tratamiento de acondicionamiento mieloablativo, el uso de acondicionamiento de intensidad reducida (RIC: reduced intensity conditioning), se ha generalizado en este grupo de pacientes. En este sentido, algunos estudios sugieren que el RIC permite obtener unos resultados superiores a largo plazo en comparación con el acondicionamiento mieloablativo a expensas de una menor mortalidad relacionada con el trasplante. Así, Bensinger y colaboradores analizaron sus resultados en trasplante en pacientes con mieloma múltiple durante un período de 34 años.

Un total de 278 pacientes recibieron trasplante alogénico, 144 mieloablativo y 134 no mieloablativo. Observaron que los pacientes presentaban menor mortalidad relacionada con el trasplante, mejor supervivencia libre de progresión y supervivencia global [275]. Sin embargo, no han disminuido ni el índice de recaídas ni la incidencia de EICR. De hecho, el índice de recaídas parece ser incluso mayor con el uso de RIC. Así, la variable más importante para predecir los resultados de los pacientes tras alo-RIC es el estatus de la enfermedad en el momento del trasplante [276, 277] y, por esta razón, en estos pacientes se insistirá en la aplicación de cualquier tratamiento de rescate que mejore el estatus de la enfermedad previo al trasplante. Por lo tanto, son necesarias nuevas intervenciones que permitan reducir tanto la incidencia de EICR como el índice de recaídas.

En este contexto, hay que destacar el papel que los inhibidores del proteosoma. A diferencia de la quimioterapia convencional, el bortezomib representa una nueva generación de agentes contra el cáncer dado que tiene la capacidad de influir en el conjunto de mecanismos de regulación celular.

Los mecanismos de actividad antitumoral establecidos para bortezomib incluyen diversas vías consideradas esenciales para la viabilidad y proliferación de la célula tumoral. Se ha demostrado la existencia de los siguientes mecanismos *in vitro* e *in vivo* [278, 279]:

- Induce directamente la apoptosis de las células tumorales.

- Inhibe la activación de NF- κ B en las células y el microambiente del tumor
- Reduce la adherencia de las células de mieloma de las células del estroma medular.
- Bloquea la producción y señalización intracelular de IL-6 en las células de mieloma.
- Bloquea la producción y la expresión de mediadores pro-angiogénicos.
- Repara defectos en los reguladores de apoptosis, como la sobreexpresión de Bcl-2 y los cambios en el supresor de tumores p53.
- Actúa independientemente del ciclo celular.
- Estabiliza las proteínas reguladoras del ciclo celular.
- Se activa bajo condiciones hipóxicas.

Con el fin de aumentar la eficacia del procedimiento y disminuir el riesgo de recaídas postrasplante, en la actualidad se está evaluando la incorporación de nuevas terapias en el contexto del trasplante alogénico, tanto en el régimen de acondicionamiento como en el mantenimiento postrasplante. Kröger *et al.* [280] evaluaron el uso de IMiDs y/o los inhibidores del proteasoma asociados a infusiones de linfocitos del donante (DLI) tras trasplante. Treinta y dos pacientes recibieron DLI, más un IMiD o bortezomib en caso de ausencia de respuesta. Diecinueve de ellos alcanzaron remisión completa de los cuales 17 no tenían evidencia de enfermedad por criterios de

citometría de flujo y 15 por análisis molecular. También Kröger *et al.* evaluaron el uso de lenalidomida postrasplante en 33 pacientes sometidos a trasplante alogénico tras haber recaído tras un trasplante autólogo. Veinticuatro pacientes iniciaron la terapia de mantenimiento con lenalidomida a 5 mg / día durante una mediana de 6 ciclos. La incidencia acumulada de recidiva a los 3 años fue del 42% y la probabilidad estimada de 3 años de SLP y SG a 3 años fueron 52% y 79% respectivamente [281].

Alsina *et al.* realizaron un ensayo multicéntrico para determinar la seguridad del mantenimiento con lenalidomida. Treinta pacientes con MM de alto riesgo recibieron mantenimiento con lenalidomida a partir del día (mediana) 96 postrasplante. Once pacientes (37%) completaron el mantenimiento. Las razones más comunes para la discontinuación fueron la aparición de EICR (37%) y progresión de la enfermedad (37%), con una SLP de 63% a 3 años [282].

En resumen, la lenalidomida de mantenimiento postrasplante parece eficaz, incrementando la tasa de respuestas y su duración, sin embargo, para evitar el desarrollo de EICR, es recomendable el uso de dosis bajas (5 mg) y un comienzo diferido postrasplante (nunca antes de los 3 meses y preferiblemente a partir de los 6).

También en lo que al acondicionamiento se refiere, algunos estudios han evaluado la seguridad y eficacia de la inclusión de nuevos fármacos dentro del

arsenal terapéutico. En este sentido, dentro del GEM, en el trabajo de Caballero-Velázquez y colaboradores [283] describimos por primera vez el uso de bortezomib en combinación con fludarabina y melfalán como régimen de intensidad reducida en 16 pacientes con MM de alto riesgo que habían recaído previamente a trasplante autólogo y de los que 13 fueron tratados con bortezomib con anterioridad. Quince pacientes mantienen (n=6) o mejoran el estado de la enfermedad (n=9) postrasplante incluyendo 11 con enfermedad activa al trasplante. A día +100 postrasplante 9 pacientes se encontraban en remisión completa (RC) y 5 alcanzaban respuesta parcial (RP). La MRT, recaída y supervivencia global a 3 años fueron del 25%, 54% y 41%, respectivamente. Nishihori et al [284] exploró un enfoque similar, pero como consolidación tras primera remisión. Veintidós pacientes recibieron fludarabina más melfalán con (n = 13) o sin (n = 9) bortezomib. La SLP a 2 años fue del 75%.

Así, el tratamiento con bortezomib pre y post allo-RIC es una opción posible para contrarrestar el riesgo aumentado de recaída tras el trasplante alogénico debido a su efecto pro-apoptótico en las células MM y también en las células T alorreactivas.

En resumen, la disponibilidad de nuevos fármacos con actividad frente al mieloma múltiple, tanto inhibidores del proteosoma, inmunomoduladores, anticuerpos monoclonales o inhibidores de histona, entre otros, abren un

abanico de posibilidades adyuvantes en el contexto del trasplante alogénico.

El segundo objetivo para mejorar los resultados del trasplante alogénico en estos pacientes debería ser el desarrollo de nuevas estrategias para minimizar el riesgo de EICR. En este sentido, varios estudios previamente mencionados han demostrado que bortezomib inhibe la activación de células T y puede inducir la apoptosis selectiva entre células T alorreactivas activadas [212]. Estos estudios han sido recientemente confirmados en un ensayo clínico [216] en una serie de 23 pacientes que recibieron trasplante alogénico de donante compatible no emparentado con la combinación de tacrolimus y metotrexato. Además, se ha visto que bortezomib no afecta la viabilidad de linfocitos T reguladores y permite la expansión de linfocitos T con propiedades supresoras.

En el estudio de Caballero-Velazquez *et al.*, fue demostrado el efecto sinérgico de la combinación de sirolimus y bortezomib en la prevención de la EICR en modelo murino, dado que inhibía la activación y proliferación de los linfocitos T estimulados y la producción de citoquinas Th1 (IFN γ , IL-2 y TNF) [219]. Es más, esta combinación también podría afectar de forma sinérgica la viabilidad de las células del mieloma reduciendo, por tanto, el riesgo de recaída.

HIPÓTESIS

La traslocación de NF- κ B al núcleo constituye un elemento central de la activación tanto de las DCs como de los linfocitos T convencionales. Sin embargo, los linfocitos Treg son resistentes al efecto proapoptótico que ejercen los inhibidores de proteosoma sobre los linfocitos convencionales activados.

El uso de inhibidores de proteosoma *in vitro* o *in vivo* permitiría prevenir la aparición de EICH. *In vitro* permitiría una alodepleción selectiva de linfocitos aloreactivos manteniendo la reactividad del inóculo frente a patógenos o frente a células tumorales e *in vivo*, en combinación con sirolimus, permitiría reducir el riesgo de EICH manteniendo además la eficacia antitumoral del procedimiento en pacientes con mieloma múltiple.

OBJETIVOS

**1. EN RELACION CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB
EMPLEADO *IN VITRO* EN LA PROFILAXIS DE EICH
(*ALODEPLETE*):**

Desarrollo de un nuevo procedimiento que permita generar un producto consistente en linfocitos alodeplecionados que mantengan el efecto antitumoral del inóculo y su reactividad frente a patógenos en el contexto del trasplante hematopoyético.

**2. EN RELACIÓN CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB
EMPLEADO *IN VIVO* EN LA PROFILAXIS DE EICH (*ENSAYO
CLINICO EMN*):**

- Evaluar la toxicidad de bortezomib en combinación con sirolimus +/- tacrolimus y
- Analizar la incidencia de EICR con esta combinación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EN RELACION CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB EMPLEADO *IN VITRO* EN LA PROFILAXIS DE EICH (*ALODEPLETE*):

1.1. Condiciones del cultivo mixto

Con el fin de averiguar donde llevar a cabo el cultivo celular: realizamos co-cultivos de linfocitos T CD3⁺ seleccionados inmunomagnéticamente (células respondedoras) con CMN deplecionadas de CD3 (células estimuladoras) de dos sujetos diferentes. En ambos casos tanto las células CD3⁺ como las CMN se obtuvieron a partir de buffy coats de donantes sanos. La selección y la depleción de las células CD3⁺ se realizó mediante AutoMACS™ (CliniMACS™ únicamente en las muestras haploidénticas). Las CMN estimuladoras se irradiaron con 30 Gy antes del cultivo.

El co-cultivo se realizó a una proporción 3(células respondedoras):1(células estimuladoras irradiadas) y se resuspendió en medio de cultivo TexMACS (medio definido de cultivo de células T libre de suero), hasta alcanzar una concentración final de 5×10^6 CD3⁺/mL. El cultivo mixto se mantuvo durante 96 h tanto en FLASK de 175 cm² como en bolsas de cultivo

estériles de 100 mL, permeables a gas con conexiones Luer (Cell Expansion Bags de Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany).

Transcurridas 48h del inicio del cultivo se añadió bortezomib a una concentración de 1000 ng/ml y después de otras 48 h (96 h totales) se procedió al lavado y al estudio del producto obtenido tal y como se especifica más adelante. Se requirieron aproximadamente 3×10^6 CD3+/ml de producto alodeplecionado para su uso clínico.

En cuanto a las condiciones de las distintas bolsas empleadas:

- Bolsa MACS® GMP Cell expansion Bag-100:

- * Concentración de 5×10^6 cél/ml ($V=40$ ml)
- * Cultivo mixto: linfocitos T_A + CMN-CD3_B irradiadas (3:1)
- * Concentración de bortezomib 10-12 nM
- * Adicionar el fármaco tomando la mitad del volumen de la bolsa: 24h

s/a + 24h c/a.

- Bolsa MACS® GMP Cell expansion Bag-250:

- * Concentración de 5×10^6 cél/ml ($V=200$ ml)
- * Cultivo mixto: CMN_A + CMN-CD3_B irradiadas (5:1)
- * Concentración de bortezomib 12 nM
- * Adicionar el fármaco tomando la mitad del volumen de la bolsa: 24h

s/a + 24h c/a.

1.2. Efecto de la congelación en el cultivo mixto

Con el fin de comprobar si la alodepleción puede realizarse después de la congelación de las células CD3+ y de las CMN: se llevó a cabo el mismo experimento pero en este caso con células CD3+ y CMN congeladas. Nuestro objetivo fue comprobar si el producto alodeplecionado tenía las mismas características partiendo de un cocultivo de células frescas o de células congeladas previamente.

1.3. Validación del producto alodeplecionado

Con el fin de conocer el estado del producto alodeplecionado la muestra fue sometida a los siguientes controles:

- Cultivos microbiológicos
- Cultivo secundario con las mismas CMN que se emplearon en el cultivo primario o bien frente Ag pp65: de este modo se puede comprobar la ausencia o persistencia de respuesta inmune frente a las células del receptor o frente a patógenos como CMV. Para ello fueron recogidos linfocitos tras la alodepleción que se estimularán durante 24 horas con CMN del receptor o con péptido pp65 como hemos descrito anteriormente.

- Estímulo con CMN: las CMN de este cultivo secundario fueron previamente congeladas y posteriormente marcadas con el colorante verde fluorescente

PKH-67. La fluorescencia emitida por las células marcadas con PKH-67, se analizará por citometría de flujo en FL-1. La activación linfocitaria se analizó mediante citometría de flujo con las combinaciones PKH/INF/CD4/CD8 y PKH/CD25/CD4/CD8 y mediante la técnica ELISPOT.

- Estímulo con el péptido pp65: Para ello se estimuló con el MACS GMP PepTivator HCMV pp65 system (Miltenyi), comercialmente disponible. La reactividad linfocitaria frente a CMV se analizó mediante citometría de flujo empleando la combinación CD25/INF/CD4/CD40L y mediante la técnica ELISPOT (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay: ‘ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos’). Esta técnica es capaz de detectar cuantitativamente el número de células en una población productora de anticuerpos específicos contra un antígeno determinado o un antígeno contra el que se dispone de un anticuerpo específico. Aquí, las placas se recubren con el antígeno reconocido por el anticuerpo de interés o con el anticuerpo específico para el antígeno cuya producción se valora. Seguidamente, se añade a las placas recubiertas una suspensión de la población celular que se investiga e incuba. Las células se disponen en la superficie de la placa, y las moléculas secretadas reactivas a las moléculas de captura son unidas en la cercanía de las células secretoras, produciéndose un anillo de complejos antígeno-anticuerpo alrededor de cada célula que sintetiza la molécula de interés. Después, la placa se lava y un anticuerpo unido a enzima específico para el antígeno secretado, o para la

especie de anticuerpo secretado, se añade y deja que se unan. El posterior revelado del ensayo mediante adición de un sustrato cromógeno o emisor de luz adecuado, indica la posición de cada célula productora de anticuerpo (o de antígeno) como un punto de color o luz. En nuestro estudio, hacemos cultivo mixto de producto alodeplecionado con CMN de receptor o CMN de donante pulsadas con péptidos de CMV a diferentes ratios y se incubaba 24 h. Después, seguimos el protocolo ELISPOT.

- La viabilidad del producto alodeplecionado se determinó mediante el kit de Anexina-V, 7-AAD de BD para citometría de flujo mediante la combinación CD25/Anexina V/7-AAD/CD3.

2. EN RELACIÓN CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB EMPLEADO IN VIVO EN LA PROFILAXIS DE EICH (*ENSAYO CLINICO EMN*)

2.1. PACIENTES

2.1.1. Diseño del estudio

Con el fin de evaluar la capacidad de Bz para inducir una alodepleción in vivo así como su posible efecto sinérgico con la quimioterapia de acondicionamiento de intensidad reducida pretrasplante, se planteó un ensayo clínico multicéntrico, abierto, secuencial fase I.

Cada 5 pacientes incluidos se realizó un análisis de seguridad.

Si se cumplían los criterios de eficacia pero no los de toxicidad, estaba planificada una reducción de la dosis de Bz.

Si se incumplían criterios de eficacia se valoraría asociar tacrolimus a la profilaxis de EICH.

El período de inclusión fue de marzo de 2012 a junio 2016.

2.1.2. Criterios de elegibilidad

- Criterios de inclusión

Pacientes adultos mayores de 18 años y menores de 70 con indicación de trasplante a criterio del facultativo responsable. Los primeros 10 pacientes debían encontrarse más allá de la primera RC, los siguientes únicamente ser candidatos a trasplante alogénico.

- Criterios de exclusión

Los pacientes con alguno de los siguientes criterios no fueron incluidos en el ensayo: ser portador del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), antígeno de superficie de hepatitis B o infección activa por virus de la hepatitis C; haber presentado un infarto agudo de miocardio en los seis meses previos a su entrada en el estudio, o presentar insuficiencia cardiaca clase funcional (NYHA) III o IV, angina no controlada, arritmia incontrolada o isquemia aguda o isquemia aguda detectada en el ECG, o anomalías del sistema de conducción; historia previa de enfermedades malignas además del mieloma

(excepto carcinoma de células basales o escamosas en piel, carcinoma in situ en cérvix o mama) a no ser que el paciente esté libre de enfermedad por más de 5 años; hipertensión arterial o diabetes mal controlada; historia previa de patología grave (cirrosis, neuropatía periférica \geq grado 2, enfermedad psiquiátrica, pericárdica o infiltrado pulmonar difuso e hipersensibilidad a Bz, ácido bórico o manitol).

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado para participar en el ensayo clínico “trasplante alogénico de acondicionamiento de intensidad reducida (RIC): optimización del programa para pacientes de alto riesgo de recaída”.

El ensayo clínico original fue registrado en www.clinicaltrialsregister.eu como EudraCT: 2010-018594-37.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a los postulados éticos de la revisión del año 2000 de la declaración de Helsinki.

El ensayo fue aprobado por el Comité Autonómico de Ensayos Clínicos de Andalucía y por los comités éticos locales de todos los centros participantes.

2.1.3. Criterios para valoración de la seguridad

La seguridad se evaluó mediante la valoración de los acontecimientos adversos en todos los pacientes desde el primer procedimiento relacionado con el estudio hasta 30 días después del periodo de tratamiento. La severidad de los

acontecimientos adversos se valoraron de acuerdo a la clasificación del National Cancer Institute (NCI) common toxicity criteria (CTC), versión 4.0.

La seguridad se analizó cada 5 pacientes incluidos en los primeros 10 pacientes y después cada 10 pacientes.

Los criterios de seguridad se valoraron en términos de (1) injerto definido como > 500 granulocitos / microL y > 20.000 plaquetas / microL x 3 días consecutivos, requeridos para 9/10 pacientes, (2) incidencia de neuropatía grados 3-4 atribuidas a Bz $> 20\%$ (3) incidencia de toxicidad gastrointestinal atribuida a Bz $> 15\%$.

En caso de que se cumplieran criterios de eficacia pero no de seguridad, estaba planificada una reducción de la dosis. Si los criterios de seguridad no se cumplían después de la reducción de la dosis de Bz, entonces la profilaxis de la EICH se cambiaría al protocolo abajo definido.

2.1.4. Selección de donante

Para los primeros 10 pacientes fue empleado un donante emparentado compatible (HLA idéntico) y para los siguientes donante compatible emparentado o no emparentado (permitiéndose un máximo de una coincidencia).

2.1.5. Acondicionamiento

Todos los pacientes recibieron un régimen de acondicionamiento de intensidad reducida basado en:

- Bz 1.3 mg/m² iv -9 antes del trasplante.
- Fludarabina 30 mg/ m² iv días -6, -5 y -4 antes del trasplante.
- Melfalán 140 mg/m² i.v día - 3 antes del trasplante.
- Bz: 1.3 mg/m² iv día -2 antes del trasplante.
- Infusión de células madre progenitoras ($> 5 \times 10^6$ CD34+ células / kg): día 0.

2.1.6. Profilaxis infecciosa

Las estrategias preventivas de infecciones bacterianas, virales y fúngicas se llevaron a cabo según la política de cada centro, basada en las guías clínicas disponibles.

2.1.7. Profilaxis de la EICR

Bz 1.3 mg/m² los días +1, +4 y +7 asociado a rapamicina a dosis de 6 mg en el día -5 y después 4 mg al día para mantener niveles plasmáticos de 6-12 ng /mL. Los niveles se monitorizaron el día +1 después del trasplante y después dos veces a la semana mientras permanecía ingresado en el hospital. Los niveles terapéuticos se mantuvieron hasta el día +100 (+/- 10 días) tras la cual, en ausencia de EICR, se procedió a una reducción lenta hasta el día +160 (+/- 10 días) cuando finalizó el tratamiento.

Si no se alcanzasen los criterios de eficacia, se añadiría tacrolimus a dosis de 0.02 mg/kg/d iv el día -3 (o la dosis oral equivalente) para mantener niveles de 5-10 ng/mL (cambiando a la vía oral tan pronto como se tolere). Se procedería a una reducción lenta desde el día +50 hasta el día +100 (+/- 10 días).

2.1.8. Procedimientos de las visitas de seguimiento

Los pacientes continuaron el seguimiento habitual de los pacientes trasplantados según el protocolo habitual de cada centro. Fueron llevados a cabo los siguientes estudios en los días +21/28, +100, +180, +270, +360 (todos +/- 10 días):

- Hemograma y bioquímica básica.
- Estudio medular con monitorización de enfermedad mínima residual.
- Quimerismo hematopoyético en sangre periférica y médula ósea.
- Electroforesis de proteínas, inmunofijación en suero y orina y cuantificación de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA).

2.1.9. Muestras biológicas

La extracción de las muestras biológicas se llevó a cabo en los siguientes momentos postrasplante:

Días +100, +180, +270 Y +365: 10 ml de sangre periférica en tubo de heparina

para estudio de diferentes subpoblaciones celulares del sistema inmune.

Días +100, +180, +270 Y +365: 28 ml de sangre periférica en tubo de EDTA para separación de linfocitos B de naive y memoria y realización de quimerismo en ambas poblaciones.

Los estudios biológicos se llevaron a cabo a partir de los 5 primeros pacientes.

Además se analizaron las mismas poblaciones celulares del sistema inmune en cuatro controles sanos.

2.1.10. Análisis estadístico

Diez end-points fueron analizados: EICH aguda global, grados 2-4 y 3-4, EICH crónica, mortalidad no relacionada con la recaída (MnRR), supervivencia global (SG) así como supervivencia libre de progresión (SLP), de evento (SLE) y de recaída (SLR).

La EICH aguda, EICH crónica y la MnRR se analizaron y compararon usando el test de Gray. La incidencia acumulada se calculó con el paquete cmprsk para el software R 2.14.0 (R Development Core Team (2011); <http://www.R-project.org/>).

Los eventos competidores se definieron así: en caso de EICH aguda y crónica el evento competidor fue la muerte sin la existencia del evento de interés. Para la MnRR el evento competidor fue la recaída. La SG, SLP y SLR

se estimaron por el método Kaplan Meier, usando SPSS version 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Los eventos fueron calculados desde el momento del trasplante de la siguiente manera: MnRR se definió como la muerte por cualquier causa (por EICH u otra causa), sin recaída previa o progresión de la enfermedad de base. La SG fue calculada desde el trasplante hasta la muerte por cualquier causa y, los pacientes que sobrevivieron fueron censurados hasta la fecha de último seguimiento. La SLE fue calculada desde el trasplante hasta la recaída o muerte, y aquéllos pacientes que no alcanzaron al menos RP en cualquier momento tras el trasplante fueron considerados también un evento para SLE. La SLR y SLP fueron definidas como la probabilidad de estar vivo sin recaída/progresión previa en pacientes en RC o al menos RP respectivamente a día +100 (momento de inicio para ambos casos). Los pacientes que mostraron evidencia de injerto pudieron ser evaluados para EICH aguda mientras que los pacientes que injertaron y sobrevivieron más de 100 días fueron evaluados para EICH crónica. Para ambas, EICH aguda y crónica, el día de aparición fue analizado como el tiempo hasta el evento en los pacientes evaluables.

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Materiales

Los reactivos necesarios para llevar a cabo los estudios de biológicos:

- Brefeldina A procede de Sigma-Aldrich, nos permite inhibir la secreción de proteínas y por lo tanto podemos emplearla para el estudio de proteínas intracelulares con activación linfocitaria. Para activación de los linfocitos T se empleo: PMA (Phorbol 12-Myristato 13 acetato) de Sigma-Aldrich e Ionomycin calcium salt from streptomyces conglobatus de Sigma-Aldrich.
- En estudios de membrana, Lysing Solution 10X Concentrate (BD FACS) se utiliza para lisar eritrocitos bajo condiciones hipotónicas preservándose los leucocitos. Para el estudio de proteínas intracelulares se empleó Cell Permeabilization Kit (FIX & PERM). Las muestras se procesan en tubos de 5 ml de Round Bottom Test Tubes, 5ML (Falcon).
- Además, como fluidos necesarios en el procesamiento y adquisición de muestras, utilizamos: Sheath Fluid (BD FACSFlow), Shutdown Solution (BD FACS), CellWASH (BD Biosciences) y Clean Solution (BD FACS).
- Para el control y calibración de los citómetros, se emplearon Cytometer Setup & Tracking (CST) Beads Kit (BD) y SPHERO Rainbow Calibration (Cytognos). La calibración y compensación de los citómetros se lleva a cabo según las recomendaciones del consorcio europeo de citometría Euroflow.

-
- Los estudios de expresión protéica del gen FOXP3 en linfocitos T se desarrollaron con el "kit" de FOXP3 Staining Buffer Set de eBioscience (San Diego, CA, EEUU).
 - Utilizamos el citómetro de flujo modelo FACSCanto II (Becton Dickinson Bioscience San Jose, CA, EEUU) y los programas informáticos: para análisis Infincy 7.1 (Cytognos S.L. Salamanca, España), para adquisición FACSDiva (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, EEUU). El análisis estadístico se realizó mediante el programa estadístico SPSS software program (SPSS 20.0, Chicago IL).
 - Para la separación de linfocitos B de memoria se empleo el Memory B Cell Isolation Kit human de Miltenyi Biotec y se llevó a cabo la separación inmunomagnética en AutoMACS Pro según las especificaciones del fabricante.
 - Los anticuerpos monoclonales, empleados para análisis por citometría de flujo, se detallan a continuación en la tabla 4:

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio

Ac	Fluorocromo	Isotipo	Clon	Procedencia
BDCA1	PE	Mouse IgG1κ	F10/21A3	BD Pharmingen
CCR7	PE	Mouse IgG2A	150503	R&D Systems
CD11a	FITC	Mouse BALB/c IgG2a, κ	G-25.2	BD Biosciences
CD11c	PerCP Cy5.5	Mouse BALB/c IgG1, κ	B-ly6	BD Pharmingen
CD123	APC	Mouse IgG2a	AC145	Immunostep
CD127	PE	Mouse IgG1κ	HIL-7R-M21	BD Pharmingen
CD14	APC-H7	Mouse IgG2b, κ	MΨP9	BD Biosciences
CD158a	FITC	Mouse IgM, κ	HP-3E4	BD Pharmingen
CD16	PE	Mouse IgG1	3G8	Beckman Coulter
CD16	V450	Mouse IgG1	3G8	BD Horizon
CD16	FITC	Mouse BALB/c IgG2a, κ	CLB/fcGran1	BD Biosciences
CD161	PE	Mouse C3H	DX12	BD Biosciences
CD25	FITC	Mouse IgG1κ	2A3	BD Biosciences
CD3	PerCP Cy5.5	Mouse IgG1κ	SK7	BD Biosciences
CD33	PerCP Cy5.5	Mouse BALB/c IgG1, κ	P67.6	BD Biosciences
CD4	PerCP Cy5.5	Mouse IgG1κ	SK3	BD Biosciences
CD40L	APC	Mouse IgG1κ	TRAP1	BD Pharmingen
CD45	V500	Mouse IgG1, κ	2D1	BD Biosciences
CD45RA	FITC	Mouse BALB/c IgG1, κ	L48	BD Biosciences
CD56	PE	Mouse IgG1, κ	MY31	BD Biosciences
CD56	APC	Mouse BALB/c IgG2b, κ	NCAM16.2	BD Biosciences
CD64	PE	Mouse BALB/c IgG1, κ	10,1	BD Biosciences
CD8	APC	Mouse BALB/c IgG1, κ	SK1	BD Biosciences
CD86	PE-Cy7	Mouse IgG2b, κ	IT2.2	BioLegend
CD94	FITC	Mouse BALB/c IgG1, κ	HP-3D9	BD Pharmingen
Foxp3	APC	Rat IgG2a κ	PCH101	eBioscience
HLA-DR	APC	Mouse BALB/c IgG2, κ	L243	BD Biosciences
HLA-DR	FITC	Mouse BALB/c IgG2, κ	L243	BD Biosciences

HLA-DR	V450	Mouse BALB/c IgG2, κ	L243	BD Horizon
INF-γ	PE	Mouse IgG1κ	B27	BD Pharmingen
NKAT2	PE	Mouse IgG2a, κ	DX27	BD Pharmingen
NKB1	FITC	Mouse BALB/c IgG1, κ	DX9	BD Pharmingen
Lymphogr am	CD8-CD19-FITC	IgG2a-IgG1		Cytognos
	CD3-CD56-PE	IgG2a-IgG2b		
	CD4-PECy5	IgG1		

2.2.2. Estudio de antígenos de membrana

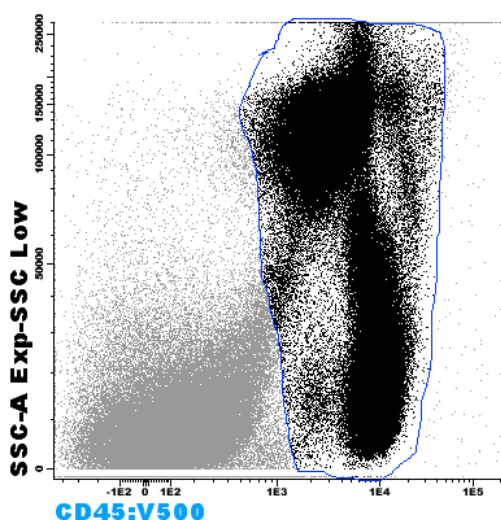
El protocolo para marcar antígenos de membrana comprende los siguientes pasos:

1. Añadir el volumen apropiado de cada anticuerpo frente al antígeno de membrana
2. Añadir 100 µl de muestra.
3. Mezclar bien.
4. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
5. Añadir 2mL de FACS Lysing solution 1X (1mL de FACS Lysing solution diluido en 9ml de agua destilada).
6. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
7. Centrifugar durante 5 minutos a 2000rpm.
8. Retirar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur.
9. Lavar con 2mL de Cell-Wash+ 0.5% de BSA.
10. Mezclar bien.

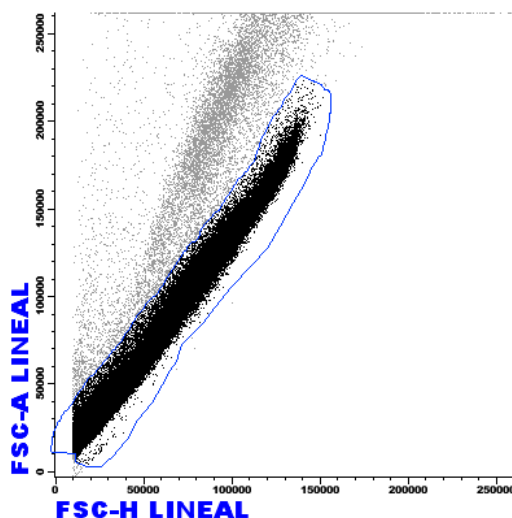
11. Centrifugar durante 5 minutos a 2000rpm
12. Retirar el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur dejando aproximadamente 50μL en el tubo.
13. Resuspender el pellet en 300μL de Facs Flow + 0.5% de BSA.
14. Adquirir en el citómetro FACSCanto II empleando el programa FACS Diva.
15. El análisis se lleva a cabo con el programa Inficyt (Cytognos) versión 1.7

Estrategia de análisis: para el análisis por citometría de flujo de cualquiera de los estudios realizados se realiza la misma estrategia de análisis:

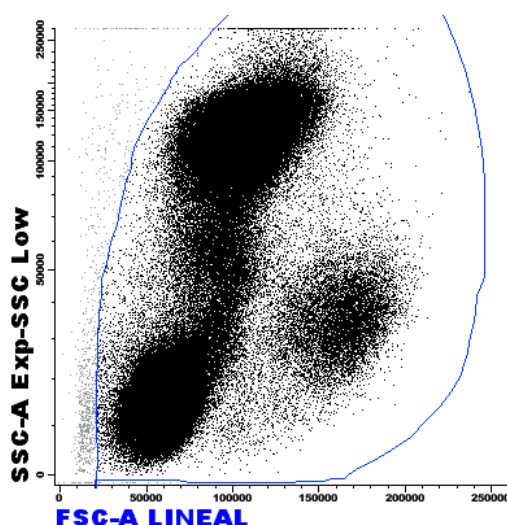
1. En primer lugar se identifica la población hematológica empleando el diagrama que enfrenta CD45, el antígeno panleucocitario, a la complejidad celular (SSC). Seleccionamos las células positivas para CD45.



2. Para poder eliminar los dobletes se utiliza el diagrama que enfrenta el área y altura de la dispersión frontal de la luz (FSC-A/FSC-H), y para retirar el "debris" (detritus).



3. Por último seleccionamos la población que tiene adecuado tamaño y complejidad celular según las características de dispersión de luz de las células (FSC/SSC).



2.2.2.1. Análisis inmunofenotípico de las poblaciones de granulocitos, monocitos y DCs

Para evaluar inmunofenotípicamente los granulocitos (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), monocitos y DCs empleamos las dos combinaciones de anticuerpos monoclonales descritas a continuación:

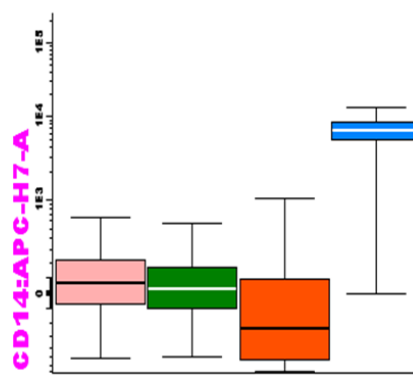
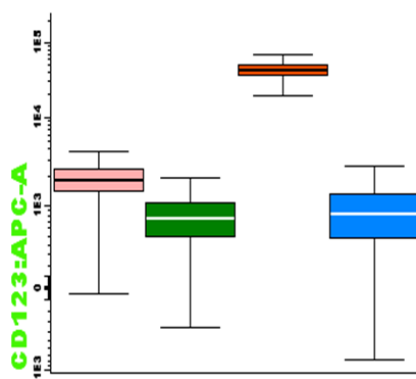
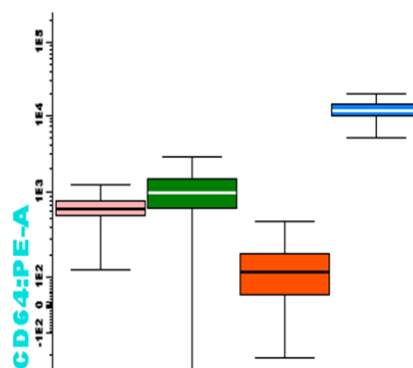
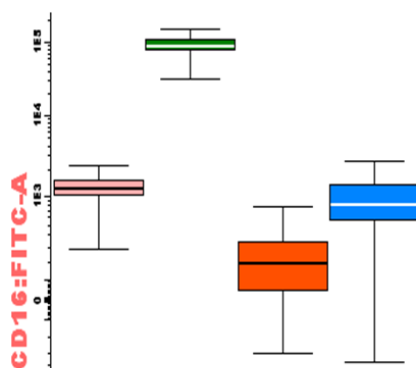
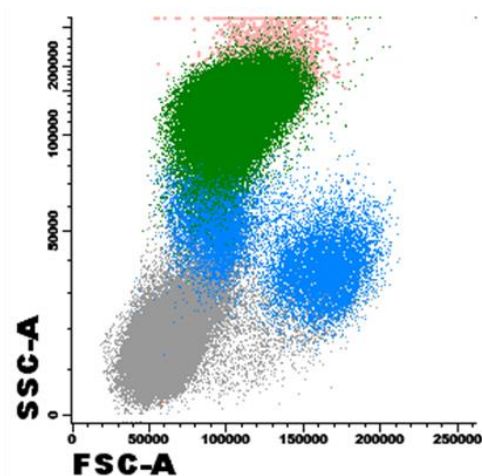
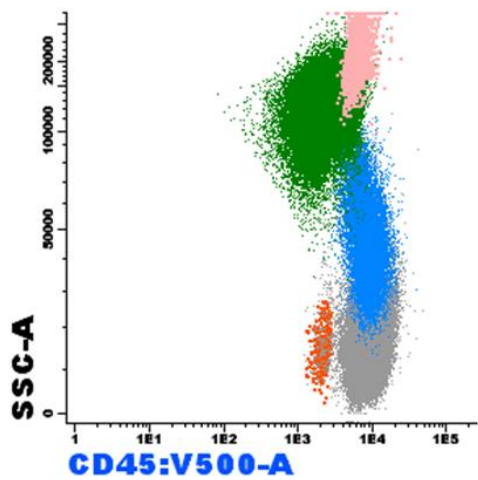
V450	V500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PE Cy7	APC	APCH7
CD16	CD45	HLADR	BDCA1	CD11c	CD86	CD123	CD14
HLADR	CD45	CD16	CD64	CD33		CD123	CD14

Se llevó a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana genérico y se adquirieron 500.000 eventos para su análisis.

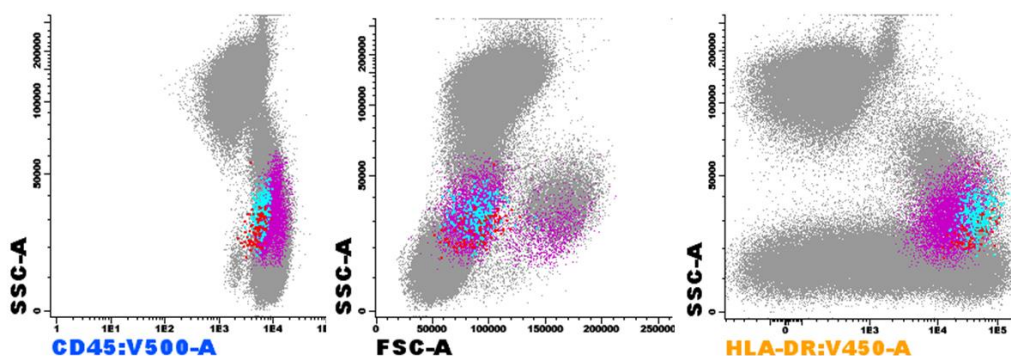
Respecto a la población de granulocitos y monocitos (empleando la segunda combinación de anticuerpos):

- ✓ Se identifican los **neutrófilos** segmentados por ser CD16 positivos, CD64 y CD33 positivo débil/negativo en ausencia de HLADR, CD14 y CD123.
- ✓ Los **eosinófilos** se caracterizan por ausencia de expresión de CD16, CD123, CD14 y CD64, expresión débil de CD33 y CD45++ con elevada complejidad y tamaño.
- ✓ los **basófilos** son CD123++, CD33+d, CD45+d, negativo para CD14, CD16, CD64 y HLADR.

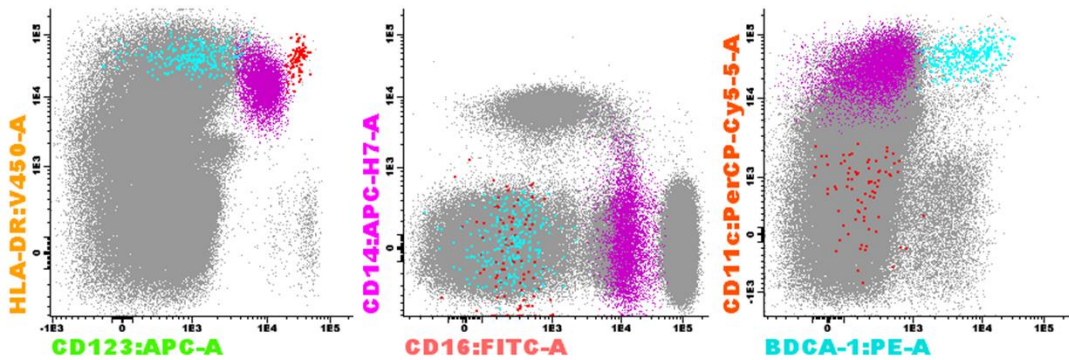
- ✓ Los [monocitos](#) se caracterizan por expresión intensa CD33 y CD64, positivo para CD14, HLADR y CD45 y negativo para CD16.



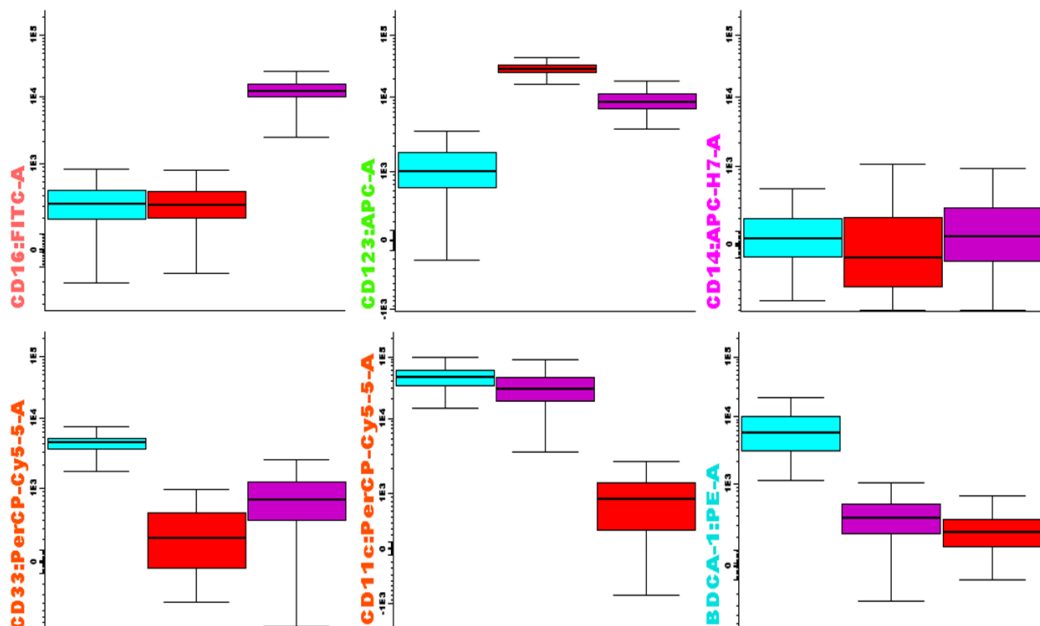
Respecto a la población de DCs: se diferencian tres poblaciones positivas para HLADR, por ser células presentadoras de antígeno, y se sitúan en un tamaño y complejidad y con una expresión de CD45 determinada, según se muestra en los siguientes diagramas.



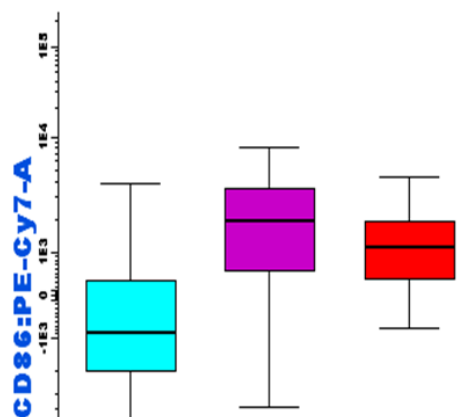
- ✓ **Células dendríticas plasmocitoides:** de fenotipo HLADR+ CD123++ CD11c- CD16- CD14- CD33- CD64- BDCA1- CD45+. Es característica su identificación en el diagrama que enfrenta HLADR y CD123 siendo positivas para ambos marcadores (población en rojo).
- ✓ **Células dendríticas derivadas de monocitos:** de fenotipo HLADR+ CD123+d CD11c+ CD16++ CD64+d CD33-/d CD14-/d BDCA- CD45+.



- ✓ Las identificamos por su expresión de CD16, CD11c y HLA-DR siendo negativas o débilmente positivas para CD14 (población en morado).
- ✓ Células dendríticas mieloides y mieloides BDCA1: HLADR+ CD123- CD11c+ CD16- CD33++ CD14- BDCA1+ CD45+. Se seleccionan por su positividad en CD33, CD11c y HLA-DR, siendo BDCA1 positivas y negativas para CD123, CD14 y CD16 (población en azul claro).



En todas las poblaciones de CDs se evalúa la mediana de intensidad mediana de fluorescencia (en inglés median intensity fluorescence, MIF) de CD86.



2.2.2.2. Subpoblaciones linfocitarias

La evaluación de las subpoblaciones linfocitarias T, B y células NK por inmunofenotipo se realiza mediante la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales:

FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
CD8-CD19	CD3-CD56	CD4	HLADR

Se lleva a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana genérico y se adquieren al menos 100.000 eventos para su análisis.

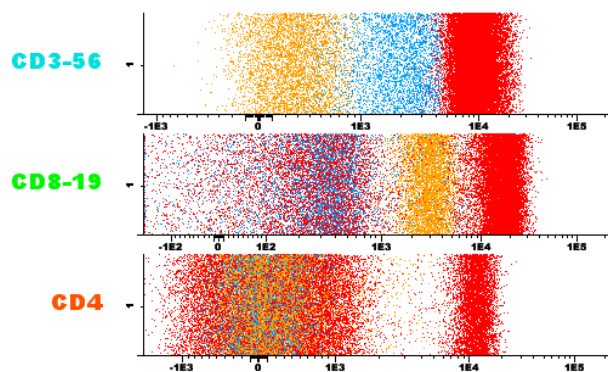
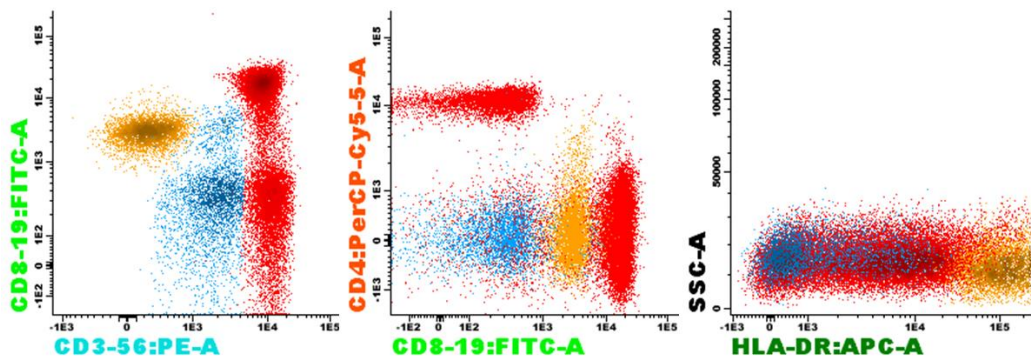
La estrategia de análisis se basa en los siguientes pasos:

-separación de los **linfocitos T** por su expresión de CD3 (en rojo), la población de eventos con mayor intensidad de fluorescencia para el fluorocromo PE (positividad fuerte). Además se diferencian las subpoblaciones T según su

expresión de CD4 y CD8, identificando los CD4+, CD8+, dobles positivos (CD4+CD8+) y dobles negativos (CD4-CD8-).

-en segundo lugar se identifican las **células NK** en azul, por su expresión de CD56, la zona de positividad débil para PE representadas en azul.

-Por último, tras retirar la población de células NK y linfocitos T CD8, podemos separar los **linfocitos B CD19+** en naranja, población situada en la zona de positividad débil de FITC y que es positiva intensa para HLADR.



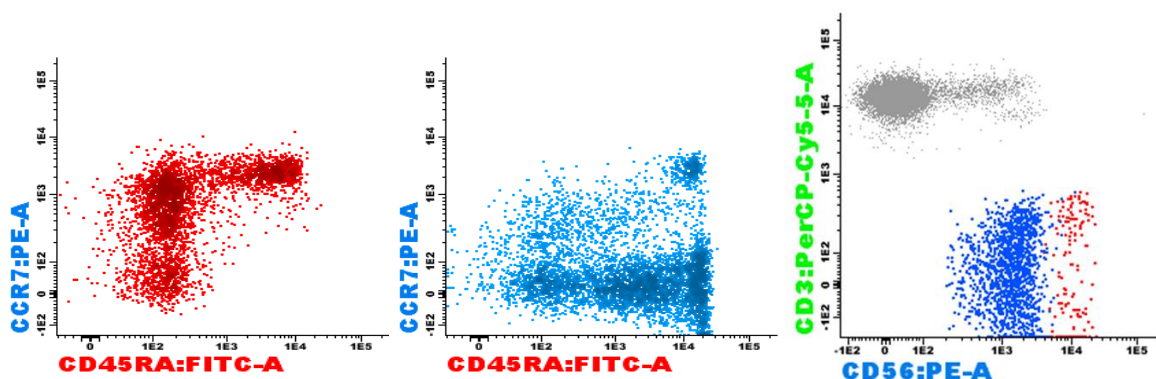
2.2.2.3. Análisis inmunofenotípico de linfocitos T naïve/memoria/efector

La combinación de anticuerpos seleccionada para la separación de los linfocitos T naïve/memoria/efector se especifica a continuación:

FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
CD45RA	CCR7	CD4	CD8

Se lleva a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana genérico y se adquieren 100.000 eventos para su análisis. Tanto en los linfocitos **CD4 (en rojo)** como en los linfocitos T **CD8 (en azul)** se diferencian según la expresión de CCR7 y CD45RA las siguientes poblaciones:

- linfocitos T naïve (N): CD45RA+CCR7+
- linfocitos T efectores (E): CD45RA+CCR7-
- linfocitos T memoria central (MC): CD45RA-CCR7+
- linfocitos T memoria periférica (MP): CD45RA-CCR7-



2.2.2.4. Análisis inmunofenotípico de células NK

Para la caracterización de las células NK se utiliza las siguientes combinaciones de anticuerpos:

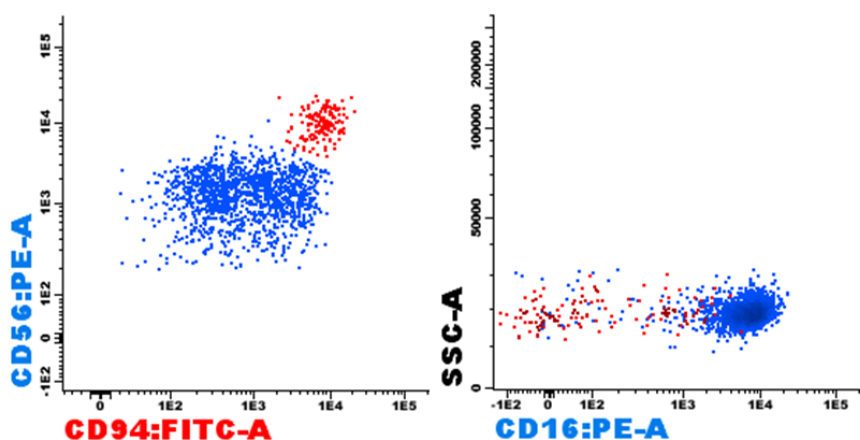
FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
CD94	CD56	CD3	HLADR
CD11a	CD16	CD3	CD56
CD158a	CD161	CD3	CD56
NKB1	NKAT2	CD3	CD56

Se lleva a cabo el protocolo para marcar antígenos de membrana genérico y se adquiere 100.000 eventos para su análisis.

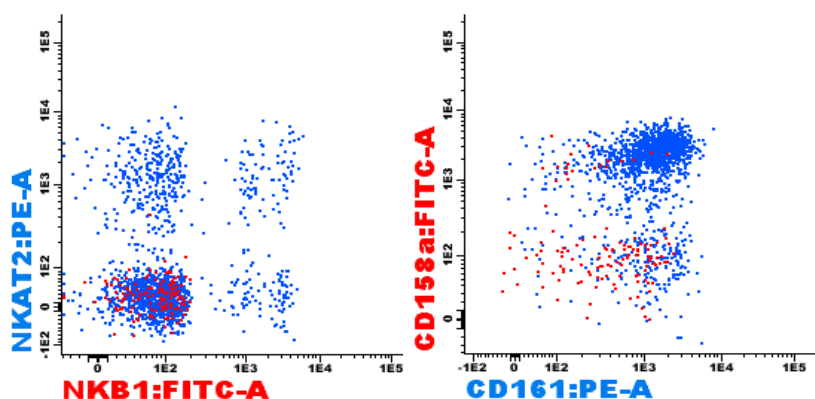
Se identifican las células NK que son negativas para CD3 y positivas para CD56. Así mismo, según su expresión de CD56 se diferencian las que lo

expresan de manera débil denominadas CD56 "weak" (en azul) y aquellas que expresan más intensamente este marcador CD56 "bright" (en rojo).

Estas últimas se caracterizan por mayor intensidad en la expresión de CD94 en práctica ausencia de CD16 como se puede ver en la siguiente representación:



Por último, se estudia la expresión de diversos receptores KIR como CD158a, NKB1 y NKAT2 y receptores NK de tipo lectina como CD161 y CD94.



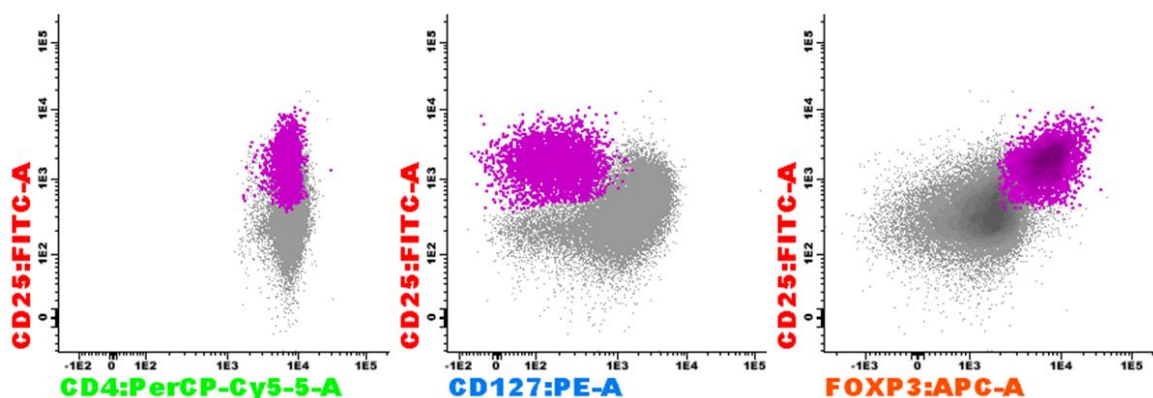
2.2.3. Estudio de linfocitos T reguladores

El estudio de Treg se lleva a cabo con la siguiente combinación de anticuerpos:

FITC	PE	PerCPCy5.5	APC
CD25	CD127	CD4	Foxp3

En primer lugar, se lleva a cabo el marcaje con los anticuerpos de membrana (CD25-FITC, CD127-PE y CD4-PerCPCy5.5.). Incubamos a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. Trascurrido este tiempo de incubación, las células se lavaron de nuevo con PBS, se centrifugaron y se re-suspendieron en 1mL de "Fixation/Permeabilization Buffer" (25% fixation/permeabilization concentrate 75% de Fixation/Permeabilization Diluent). Incubamos a 4°C durante 30 minutos, lavamos en dos ocasiones con 2mL de "1X Permeabilization Buffer" y re-suspendimos en 100µl de " 1X Permeabilization Buffer". En este momento añadimos el anticuerpo Foxp3-APC. Tras una incubación de 30 minutos, a 4°C y oscuridad, centrifugamos a 2000rpm durante 5 minutos re-suspendimos en PBS y adquirimos la muestra en el citómetro de flujo.

La estrategia de análisis consiste en la selección de los linfocitos T CD4⁺ que son positivos para CD25, en ausencia o expresión débil de CD127 y con expresión de Foxp3.



2.2.4. Activación de linfocitos

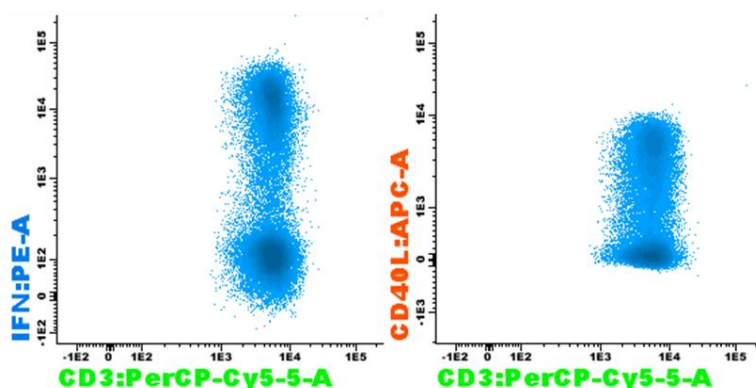
Para poder valorar activación linfocitaria, establecimos 2 condiciones de estudio:

- condición control: brefeldina A
- condición de activación: brefeldina A + PMA e ionomicina.

En una placa de 48 pocillos, se añadieron 500μL de sangre periférica junto con 500μL de medio de cultivo RPMI. A cada una de las condiciones se añade Brefeldina A a una concentración final de 10μg/ml para poder inhibir la secreción de proteínas y por lo tanto determinar la producción de IFN y la

expresión de CD40L intracelular. Además, en la condición de activación, se añaden 20µL PMA (1µg/mL) y 1µL de ionomicina (concentración 0.5mg/mL). Se incuba durante 4 horas antes del marcaje por citometría. Transcurrido este tiempo, se recogen 200 µl de muestra en tubos de citometría. El marcaje de membrana se realizó con los anticuerpos monoclonales anti-CD25-FITC y anti-CD3 PerCP-Cy5.5. Incubamos durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Para el marcaje intracitoplasmático, utilizamos el "cell permeabilization kit" que permite fijar y permeabilizar la membrana celular, manteniendo intacta la estructura, morfología y superficie de las células. Tras el marcaje de membrana se añadieron 100µL de la solución A (fijador celular) al tubo de citometría durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. A continuación, lavamos con PBS a 2000 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 100µL de la solución B para permeabilizar la membrana y seguidamente los anticuerpos intracelulares: IFN-γ PE y CD40L APC. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Tras lavar el exceso de anticuerpo, las células se re-suspendieron en 300 µl de FACSFlow y se adquirieron en el citómetro.

La estrategia de análisis consiste en seleccionar el área de producción de IFN y de expresión de CD40L en el tubo de activación frente a los linfocitos sin activar solo incubados con brefeldina A.



2.2.5. Separación inmunomagnética de linfocitos B de memoria CD27+ y análisis de quimerismo en poblaciones separadas

En primer lugar, a partir de 27 ml de sangre periférica de los pacientes se separa la fracción mononucleada mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll. A partir de la fracción mononucleada se separaron linfocitos B de memoria CD27+ empleando el Kit Memory B Cell Isolation Kit. Realizamos el procedimiento según el protocolo del fabricante. Centrifugamos a 1200 rpm durante 10 minutos, resuspendimos el botón celular en buffer, añadimos un coctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (CD2, CD14, CD16, CD36, CD43, CD235a) e incubamos durante 10 minutos a 4-8° en oscuridad. Tras esta incubación añadimos de nuevo Buffer y antibiotina conjugada con microbolas magnéticas. Volvimos a incubar 15 minutos en frio y oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, lavamos, centrifugamos y resuspendimos en un volumen de buffer de 1000μl. Para la separación

inmunomagnética empleamos el programa “Depl025” del AutoMacs Pro Separator y recogimos la fracción negativa enriquecida en linfocitos B.

A la fracción enriquecida de células B se le añadieron posteriormente microbolas magnéticas conjugadas con anti-CD27 que se incubaron durante 15 minutos a 4-8°C. Trascurrido este tiempo, lavamos, centrifugamos y re-suspendimos en buffer. Para la separación inmunomagnética empleamos el programa “Possel” del AutoMacs Pro Separator y recogimos los linfocitos B de memoria CD27+ en la fracción positiva del separador celular. La selección fracción negativa tras esta separación corresponde a una población enriquecida de linfocitos B virgen CD27-.

En ambas poblaciones se realiza el estudio de quimerismo mediante marcadores HLA de los pacientes pertenecientes al Hospital Virgen del Rocío.

2.2.6. Análisis estadístico

Diez end-points fueron analizados: EICH aguda global, grados 2-4 y 3-4, EICH crónica, mortalidad no relacionada con la recaída (MnRR), supervivencia global (SG) así como supervivencias libre de progresión (SLP), de evento (SLE) y de recaída (SLR).

La EICH aguda, EICH crónica y la MnRR se analizaron y compararon usando el test de Gray. La incidencia acumulada se calculó con el paquete

cmprsk para el software R 2.14.0 (R Development Core Team (2011); <http://www.R-project.org/>).

Los eventos competidores se definieron así: en caso de EICH aguda y crónica el evento competidor fue la muerte sin la existencia del evento de interés. Para la MnRR el evento competidor fue la recaída. La SG, SLP y SLR se estimaron por el método Kaplan Meier, usando SPSS version 13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Los eventos fueron calculados desde el momento del trasplante de la siguiente manera: MnRR se definió como la muerte por cualquier causa (por EICH u otra causa), sin recaída previa o progresión de la enfermedad de base. La SG fue calculada desde el trasplante hasta la muerte por cualquier causa y, los pacientes que sobrevivieron fueron censurados hasta la fecha de último seguimiento. La SLE fue calculada desde el trasplante hasta la recaída o muerte, y aquéllos pacientes que no alcanzaron al menos RP en cualquier momento tras el trasplante fueron considerados también un evento para SLE. La SLR y SLP fueron definidas como la probabilidad de estar vivo sin recaída/progresión previa en pacientes en RC o al menos RP respectivamente a día +100 (momento de inicio para ambos casos). Los pacientes que mostraron evidencia de injerto pudieron ser evaluados para EICH aguda mientras que los pacientes que injertaron y sobrevivieron más de 100 días fueron evaluados para EICH

crónica. Para ambas, EICH aguda y crónica, el día de aparición fue analizado como el tiempo hasta el evento en los pacientes evaluables.

Los estudios biológicos se analizaron mediante pruebas no paramétricas con el test U de Mann Whitney.

Las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. EN RELACION CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB EMPLEADO *IN VITRO* EN LA PROFILAXIS DE EICH (*ALODEPLETE*):

1.1. Puesta a punto del procedimiento de cultivo mixto (n=12)

Activación linfocitaria

Con el fin de comprobar cómo se podía obtener una mejor activación del donante, se enfrentaron CMN del donante frente a CMN del receptor deplecionadas o no de CD3 mediante AutoMACS. La activación óptima se consiguió en una proporción 3:1.

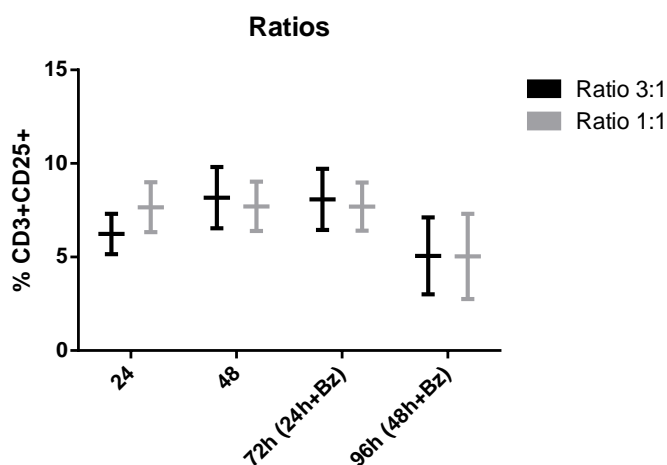


Figura 20. Comparación CMN del donante:CMN del receptor deplecionadas de CD3 en proporción 1:1 y 3:1

Confirmamos que la activación de los linfocito T del “donante” en el co-cultivo es mayor cuando enfrentamos CMN del donante a CMN deplecionadas de CD3 del “paciente”. La activación linfocitaria fue valorada mediante dos marcadores de activación, CD25 y CD69. Además, las CMN del receptor se irradiaron con el objetivo de evaluar únicamente la activación de los linfocitos del donante.

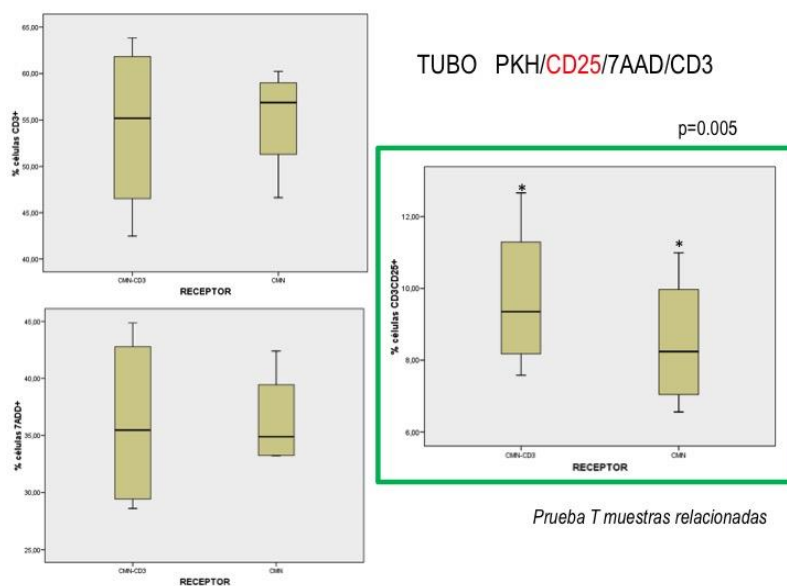


Figura 21. Medición de la activación linfocitaria usando el marcador CD25. CMN de donante se co-cultivaron con CMN de receptor deplecionadas o no de CD3. La activación fue medida mediante citometría de flujo a las 24h usando el marcador CD25 (n=4).

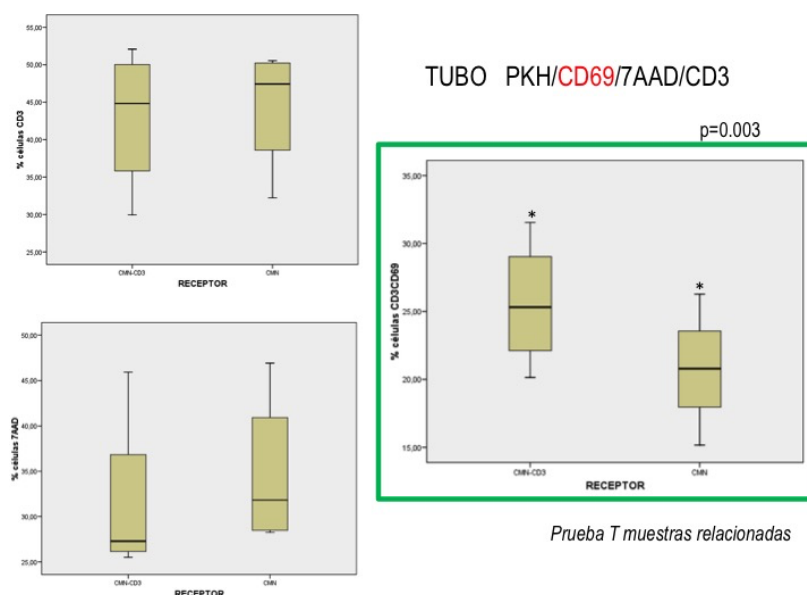


Figura 22. Medición de la activación linfocitaria usando el marcador CD69. CMN de donante se co-cultivaron con CMN de receptor deplecionadas o no de CD3. La activación fue medida mediante citometría de flujo a las 24h usando el marcador CD69 (n=4).

Alodepleción y viabilidad celular

La secuencia del procedimiento de alodepleción fue el siguiente: el cultivo mixto se mantuvo durante 48 h, después se añadió bortezumib a diferentes dosis y a las 96 h del inicio se analizó por citometría de flujo la proporción de linfocitos T no alorreactivos vs alorreactivos viable.



Figura 23. Proceso de alodepleción

Con el objetivo de definir la dosis óptima de bortezomib, se llevaron a cabo co-cultivos usando diferentes dosis del fármaco, desde 0 a 1000 nM.

Con 2 casos realizados el % medio de linfocitos no alorreactivos fue de 69.89, 74.83, 70.38, 62.17 y 63.42 a dosis de 0, 8, 9, 10 y 12 nM de Bz, mientras que estas cifras fueron 5.77, 6.41, 4.46, 4.01, 6.03 en el caso de los linfocitos alorreactivos.

Además de valorar las cifras de linfocitos T alorreactivos, no alorreactivos y viabilidad celular a distintas concentraciones de bortezomib, se estudió si el proceso de congelación podía afectar al producto alodeplecionado. Para ello, se analizó mediante citometría de flujo el mismo producto pre y post-congelación.

Se observó que la congelación no afectaba a la viabilidad celular y se mantenía el porcentaje de CD3+CD25- (figura 24 y Tabla 5).

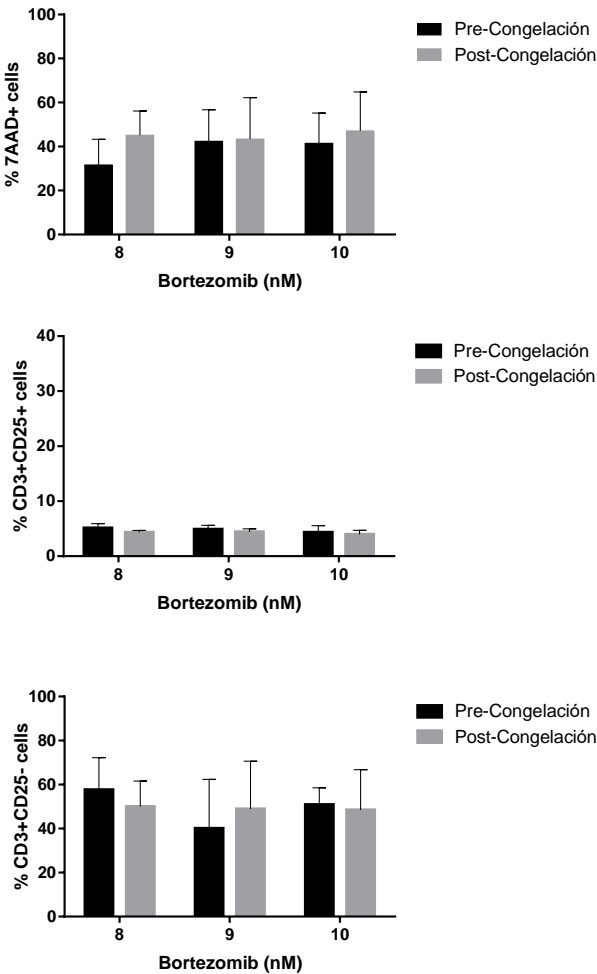


Figura 24. Comparación pre y postcongelación de muerte celular, linfocitos alorreactivos y no alorreactivos a distintas concentraciones de bortezomib

Tabla 5: Comparación del producto alodeplecionado en fresco vs descongelado

[Bz] nM	% muerte celular	% CD3 CD25+	% CD3 CD25-	% muerte celular cong	% CD3 CD25+ cong	% CD3 CD25- cong
0	23,28	5,32	71,40	36,21	4,20	59,59
8	20,05	4,64	75,31	33,27	4,67	62,06
9	29,85	5,58	64,57	21,69	5,05	73,26
10	25,89	3,66	70,45	26,86	3,96	69,18
12	36,03	3,86	60,12	34,41	4,04	61,55
0	25,38	6,23	68,39	24,58	5,31	70,11
8	22,09	3,55	74,36	20,89	4,37	74,74
9	20,46	3,34	76,19	28,07	4,00	67,94
10	41,74	4,36	53,90	25,75	4,72	69,53
12	28,93	4,35	66,72	22,81	4,64	72,55

Medios de cultivo

A continuación, se valoraron diferentes medios de cultivo: TEX MACS y α -MEM. El medio α -MEM es un medio apto para clínica ya que es un medio libre de suero, y por tanto quisimos confirmar que es un medio óptimo para mantener la viabilidad de los linfocitos no alorreactivos durante el procedimiento de alodepleción. Observamos que con este medio la viabilidad

de los linfocitos CD3+CD25⁻ era mejor que con el medio TEX MACS a la misma concentración del fármaco. Por ello, seleccionamos el α -MEM como medio óptimo para llevar a cabo el procedimiento. Así, en las siguientes gráficas vemos el porcentaje de linfocitos alorreactivos y no alorreactivos a diferentes concentraciones de bortezomib en los distintos medios.

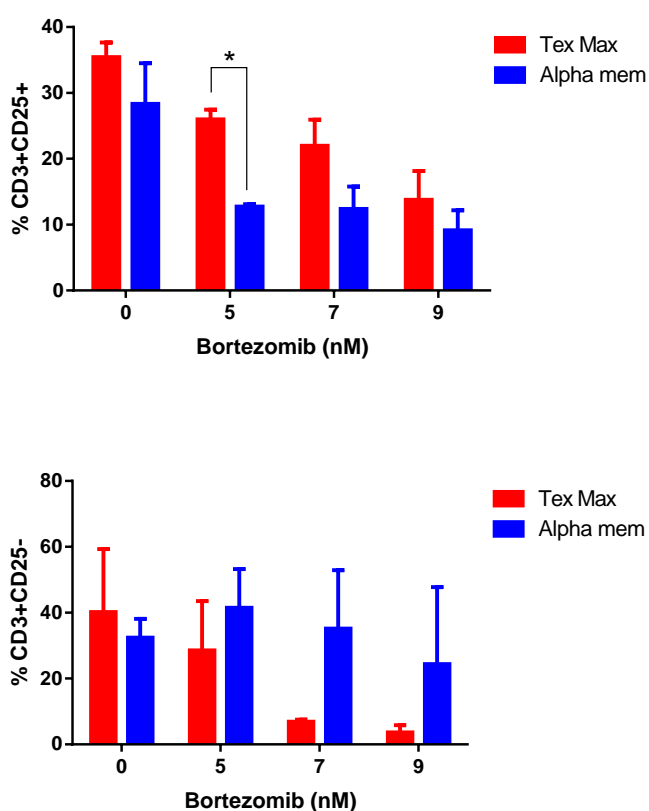


Figura 25. A. Porcentaje de linfocitos no alorreactivos y B alooreactivos con TEXMAX y Alpha MEM

En la siguiente tabla se representan los porcentajes de linfocitos alorreactivos vs no alorreactivos y la viabilidad al comparar dos medios de

cultivo mencionados y se muestra la reducción drástica de linfocitos alorreactivos al administrar bortezomib a concentraciones crecientes.

Tabla 6. Linfocitos alorreactivos vs no alorreactivos tras bortezomib

[BZ] nM	Medio	% muerte celular	% CD3 CD25+	% CD3 CD25-
0	TEX MACS	42,20	11,90	45,90
2,5	TEX MACS	39,40	7,00	53,60
5	TEX MACS	77,20	5,40	17,30
6	TEX MACS	82,30	5,10	12,60
7	TEX MACS	89,10	3,40	7,50
8	TEX MACS	94,60	2,00	3,40
9	TEX MACS	94,50	2,20	3,60
10	TEX MACS	96,80	1,30	1,90
0	α -MEM	58,30	12,30	29,30
2,5	α -MEM	45,40	7,50	47,40
5	α -MEM	56,20	8,10	35,60
6	α -MEM	75,70	4,70	19,50
7	α -MEM	79,27	3,20	17,50
8	α -MEM	79,40	3,30	17,20
9	α -MEM	81,60	3,10	15,10
10	α -MEM	88,00	2,00	9,60

Se analizó también el efectos de los distintos medios en la viabilidad celular por citometría de flujo:

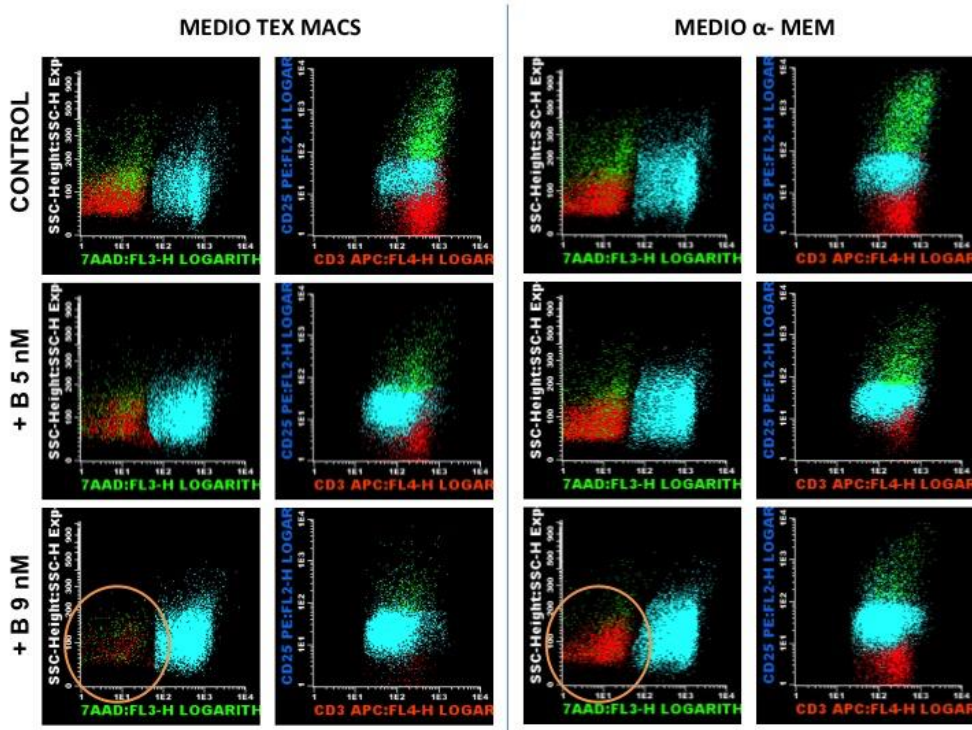


Figura 26. Comparación de los medios de cultivo TEX MACS y α -MEM en términos de viabilidad celular. Se muestra: grupo control, grupo con bortezomib 5 nM y bortezomib 9 nM. La muerte celular fue medida mediante citometría de flujo usando el marcador 7AAD.

Así, en esta primera parte pudimos concluir:

- La activación máxima de linfocitos alorreactivos se obtiene llevando a cabo el cultivo mixto con CMN del “receptor” deplecionadas de CD3.

- Irradiar la selección negativa no afecta significativamente a la activación.
- La concentración óptima de bortezomib se encuentra entre 9-12 nM para conseguir una alodepleción óptima sin afectar la viabilidad de los linfocitos no alorreactivos.
- En nuestro estudio, el medio de cultivo α -MEM mantiene mejor la viabilidad celular CD3+CD25-.
- El proceso de congelación no afecta significativamente a la viabilidad celular.

1.2. Puesta a punto del cultivo mixto: paso a bolsa BAG-100 (n=8)

A continuación llevamos a cabo la puesta a punto del procedimiento a escala clínica. Para ello, realizamos el cultivo mixto en bolsas estériles con permeabilidad de CO₂. Se evaluaron las siguientes variables:

Se evaluaron bortezomib a 10 y 12 nM empleando dos concentraciones celulares: 1 vs 5 x10⁶ células/ml. Tras los dos primeros estudios comprobamos que, a diferencia de los estudios llevados a cabo anteriormente a escala “no clínica”, la activación linfocitaria no era óptima. Por ello, y con el fin de aumentar en lo posible el contacto entre células efectoras y estimuladoras durante el cocultivo, llevamos a cabo el procedimiento en agitación (a partir de bolsa 3). En el tercer estudio con bortezomib en agitación y observamos que

funcionaba pero los linfocitos T activados viables eran del 2.92%, por lo que pasamos a aumentar la concentración de bortezomib en la siguiente bolsa).

Tabla 7. Condiciones de trabajo por bolsas

Bolsas	Concentración celular (cél/mL)	Células	Concentración Bz (nM)
Bolsa 1	1×10^6	LT donante : CMN-CD3 receptor (3:1)	10
Bolsa 2	5×10^6	LT donante : CMN-CD3 receptor (3:1)	9
Bolsa 3	5×10^6	LT donante : CMN-CD3 receptor (3:1)	10
Bolsa 4	5×10^6	LT donante : CMN-CD3 receptor (3:1)	12

Las bolsas 3 y 4 se representan en la siguiente tabla.

Tabla 8. Representación de los porcentajes de las distintas poblaciones celulares

	BZ 10nM (n.3)					BZ 12 nM (n.4)				
Poblaciones	2h	24h	48h	24h + Bz	48h + Bz	2h	24h	48h	24h + Bz	48h + Bz
CD3/CD25+/7AAD- Linfocitos activados viables	3.75	7.59	12.86	6.8	2.92	2.86	9.24	17.42	7.81	2.9
CD3/CD25+/7AAD+ Linfocitos activados muertos	0.19	0.42	3.66	3.38	8.31	0.17	0.67	3.51	5.32	15.17
CD3/CD25-/7AAD- Linfocitos no activados viables	90.15	87.36	78.24	66.80	47.40	85.68	83.23	68.77	54.22	26.37
CD3/CD25-/7AAD+ Linfocitos no activados muertos	5.91	4.63	5.23	23.02	41.37	11.29	6.86	10.31	32.65	55.56

Realizamos análisis por citometría de flujo de las distintas bolsas tras la adición de Bz a las 24, 48, 72 y 96 horas. Pudimos observar cómo tras Bz10 nM

tenía lugar un aumento progresivo de muerte celular con cada vez menor porcentaje de linfocitos activados viables (2.92%). (Figura 6).

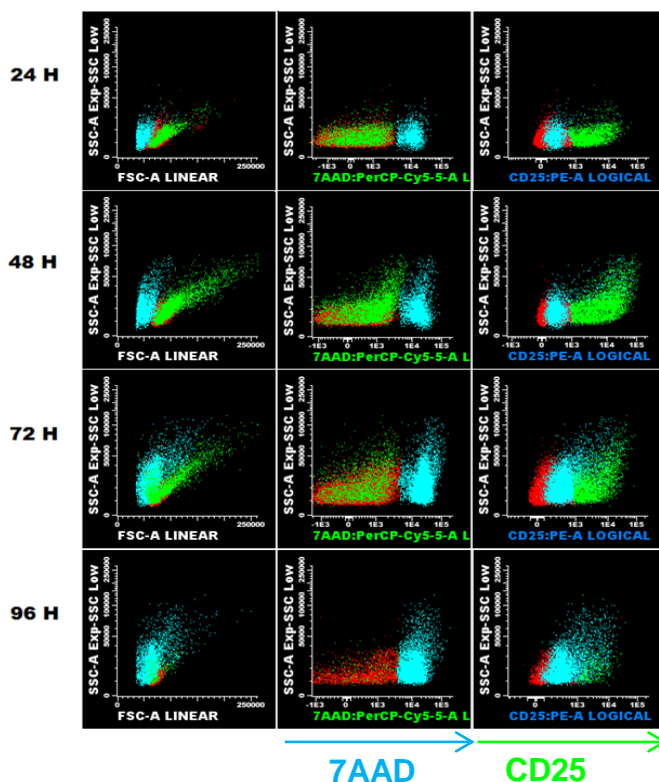


Figura 27. Representación de la bolsa 3 por citometría de flujo. La destrucción o muerte celular fue medida mediante citometría de flujo usando el marcador 7AAD y la activación por CD25.

Por otro lado, se observó que a pesar de la disminución de la viabilidad de linfocitos T, se consiguió que el porcentaje de linfocitos T alorreactivos descendiese a niveles cercanos a 0

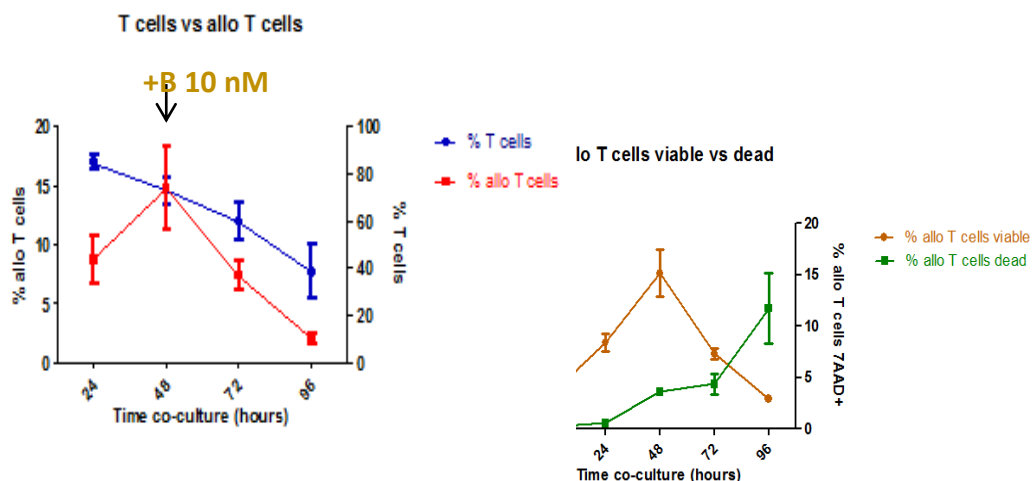


Figura 28. Representación de bolsa 3. A. Porcentaje de linfocitos T y aquellos alorreactivos. B. Representación en bolsa 3 de porcentaje de linfocitos T alorreactivos vs muertos.

Esto es, pudimos observar cómo aumenta la proporción de linfocitos T activados muertos a lo largo del co-cultivo así como la disminución de la proporción de linfocitos T activados viables con la consecuente eliminación de linfocitos alorreactivos.

1.3. Puesta a punto del cultivo mixto en bolsa BAG-250 (n= 4)

Tabla 9. Condiciones de trabajo en cada paciente

Pacientes	Bolsas 250 mL	Concentración celular (cél/mL)	Concentración Bz	Células (LTD:CMN- CD3R)	Resultados
Paciente 1	200 mL	5×10^6	10 nM	3:1	Muerte celular y activación
Paciente 2	200 mL	5×10^6	10 nM	1:1	Muerte celular y activación
Paciente 3	200 mL	5×10^6	12 nM	5:1	
Paciente 4	200 mL	5×10^6	20 nM	5:1	

Para las condiciones de las distintas bolsas representadas en la siguiente tabla, comprobamos como en las dos primeras situaciones se produjo mucha muerte y activación celular. En la muestra del tercer paciente, aunque conseguimos las condiciones óptimas el% de linfocitos activados fue solo de 3.8% mientras que en la cuarta se detectó 20% de viabilidad de CD3+CD25-.

Vimos por tanto que en la bolsa pequeña (bolsa MACS® GMP Cell expansion Bag-100) se usan linfocitos T del donante, por lo que la proporción 3:1 es preferible, pero en la bolsa grande (bolsa MACS® GMP Cell expansion

Bag-250) se usan CMN del donante completas, es por ello que es mejor usar proporción 5:1 para que haya suficientes efectoras. Esta bolsa permite una concentración de 5×10^6 cél/ml ($V=200$ ml), concentración de bortezomib 12 nM y la adición del fármaco tomando la mitad del volumen de la bolsa: 24h s/a + 24h c/a. Además, al ser necesaria una buena homogenización del fármaco y tratarse de volúmenes grandes, la agitación mejora la eficacia del fármaco.

1.4. Producto alodeplecionado

Una vez puesto a punto el proceso de alodepleción, se llevaron a cabo las técnicas de citometría de flujo y ELISPOT para testar el producto alodeplecionado.

1.4.1. ELISPOT

Mediante esta técnica se estudió tanto la alorreactividad del producto alodeplecionado, como la respuesta frente a patógeno. Con el fin de analizar el porcentaje de células productoras de IFN- γ , realizamos un cultivo mixto (CM) secundario en el que se enfrentó el producto alodeplecionado a CMN-CD3 de donante pulsadas con pp65 para estudiar respuesta a patógeno y frente a CMN-CD3 de receptor para estudiar alorreactividad. Se compararon con un CM control en el que se usaron LT control (no alodeplecionados). El producto

alodeplecionado presentó una menor respuesta (actividad linfocítica) medida como n° de células productoras de IFN- γ cuando se enfrentaron a células del receptor. Concluimos por tanto que la alorreactividad es drásticamente disminuida en el producto alodeplecionado.

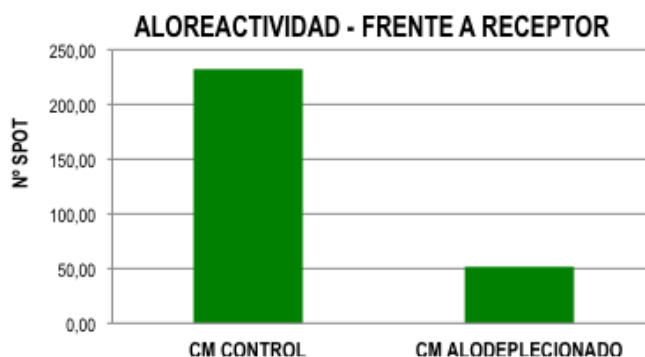


Figura 29. Cultivo mixto del producto alodeplecionado frente a CMN-CD3 de receptor comparado con cultivo mixto control con linfocitos no alodeplecionados

En cuanto a la respuesta frente a patógeno, el producto alodeplecionado, así como los linfocitos CD3 control (no alodeplecionado) se enfrentaron en cultivo con CMN del propio donante pulsadas con pp65 para estudiar respuesta del producto alodeplecionado frente a CMV.

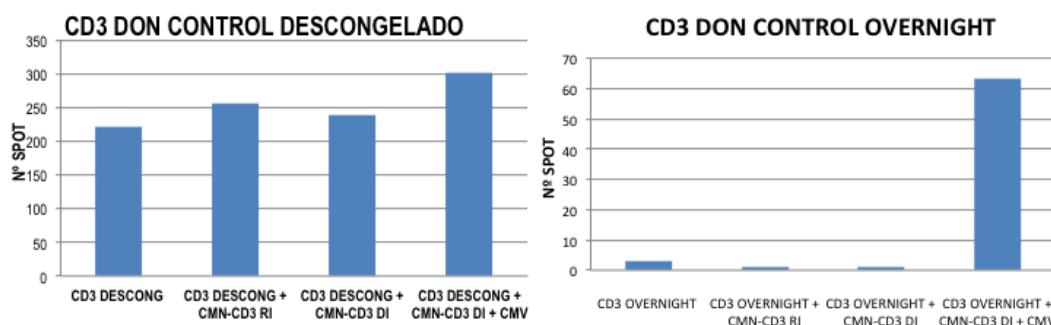


Figura 30. Respuesta frente a patógeno de linfocitos T CD3 del donante descongelado vs overnight

Así, fue observada tras este procedimiento la disminución drástica de alorreactividad preservando la respuesta frente a patógeno.

1.4.2. Citotoxicidad y activación del producto alodeplecionado (n=3)

Con el objetivo de valorar citotoxicidad y activación, empleamos bolsas de 100 ml, concentración 3:1, bortezomib 10 nM y siempre con bolsa control. Con cultivo secundario de linfocitos T aislados del donante tras ser alodeplecionados con bortezomib + CMN del propio donante por un lado, CMN del receptor y CMN de un tercer individuo (no relacionado) para comprobar si habían perdido o no la capacidad alorreactiva.

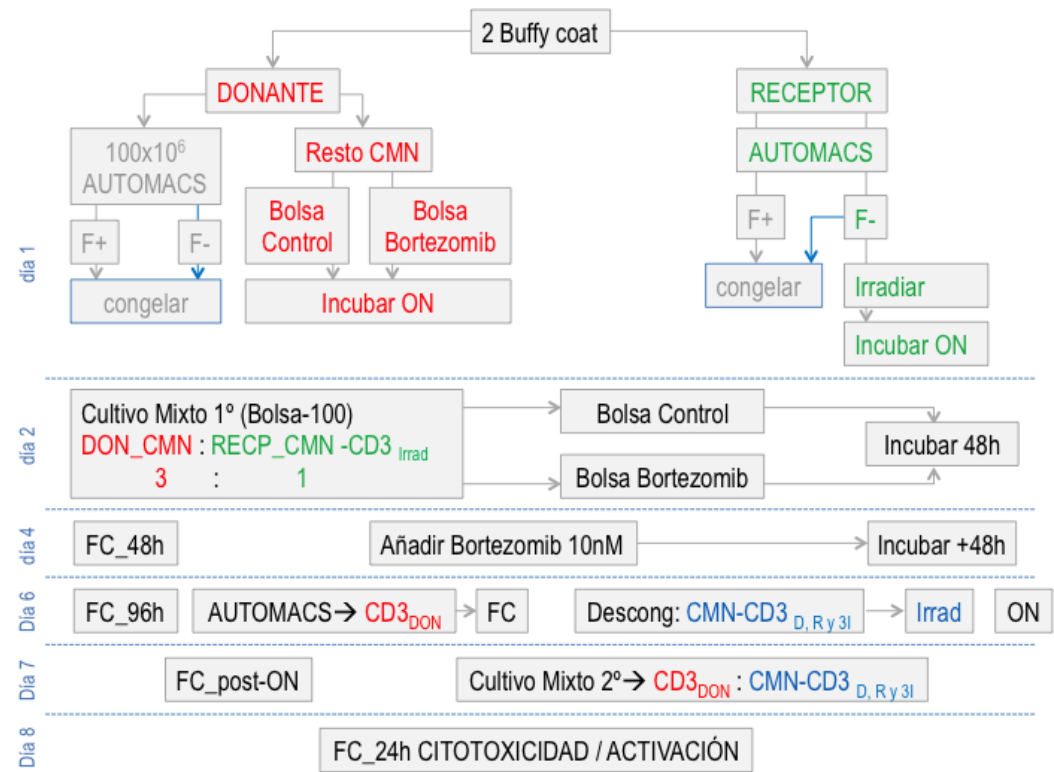


Figura 31. Esquema de trabajo para valorar citotoxicidad y activación del producto alodeplecionado

Realizamos varios experimentos para valorar citotoxicidad. Como se observa en la figura 11, el porcentaje vivo del donante (90%) disminuía la viabilidad a 66% cuando añadíamos receptor y cuando poníamos 3I disminuía aún más, a 38%.

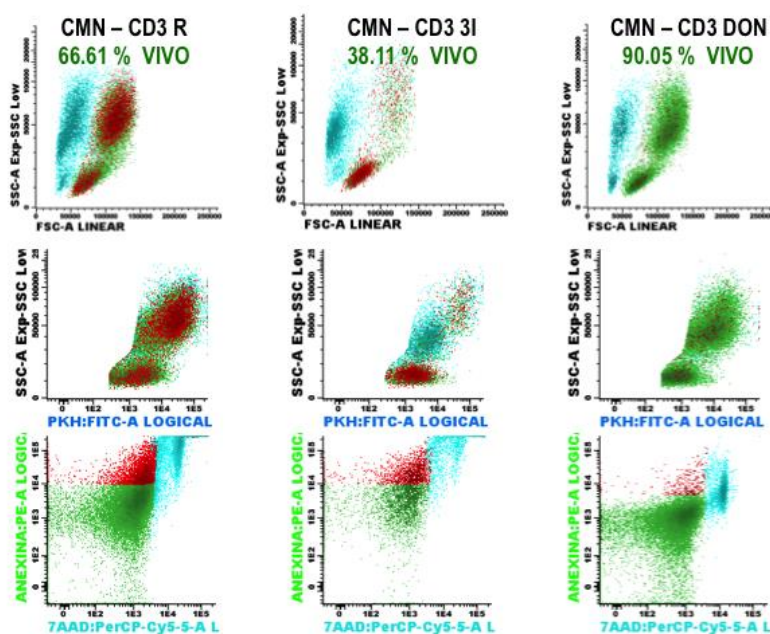


Figura 32. Citotoxicidad al enfrentar células del receptor a donante y un tercer individuo. La viabilidad celular fue evaluada mediante citometría de flujo usando los marcadores PKH y 7AAD.

Por otro lado, observamos cómo el porcentaje de CD8CD25+ (LT aloreactivos) disminuía en más de la mitad con respecto a la bolsa control:

- CD3 control: son reactivos frente a receptor (R), 3I.
- CD3 bortezomib: bajo % de CD8CD25+ frente a receptor.

El porcentaje CD4 disminuía pero no tanto, ya que los T reguladores son CD4 y se esperaba que no se vieran afectados por el bortezomib.

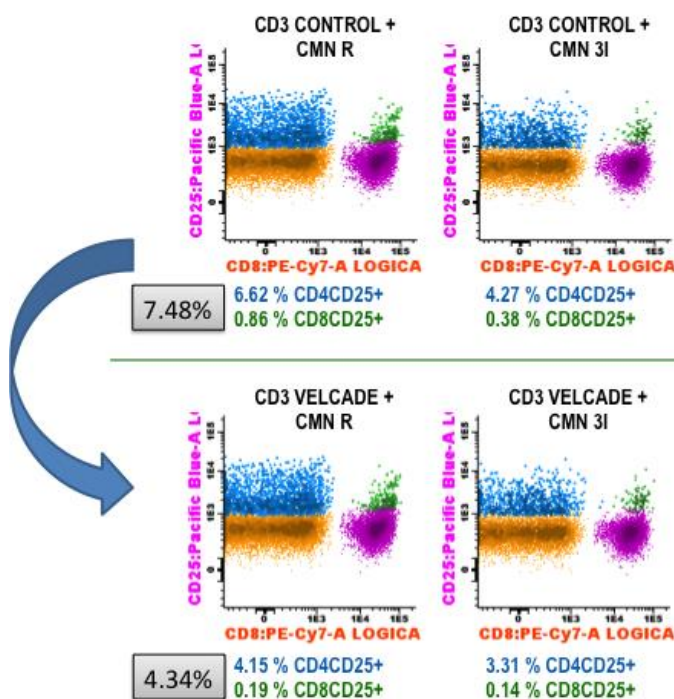


Figura 33. Porcentaje de linfocitos alorreactivos al comparar bolsa control con bolsa con adición de bortezomib. Los linfocitos alorreactivos (CD8+CD25+) y T reguladores (CD4+CD25+) fueron cuantificados por citometría de flujo.

Así, a modo resumen del procedimiento de alodepleción llevado a cabo, mostramos en la siguiente figura, el porcentaje de muerte celular (7AAD) así como de linfocitos alorreactivos (con CD25 como marcador de activación) a las distintas concentraciones de bortezomib para unas condiciones de cultivo mixto con adición de bortezomib 10 nM a las 48 horas de su inicio representado también por citometría de flujo.

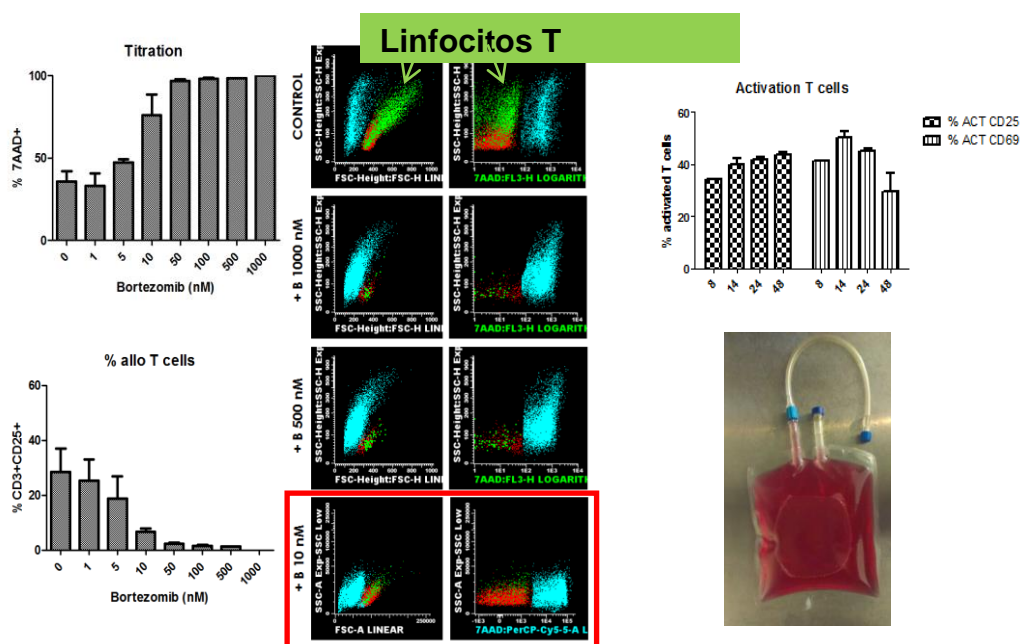


Figura 34. Resultado del procedimiento de alodepleción con bortezomib a 10 nM

1.5. Combinación terapéutica de bortezomib y ciclofosfamida (n=4)

Testamos diferentes concentraciones de CFM entre 0.5 y 5 microgramos/ml +/- bortezomib a 10 nM pero no obtuvimos conclusiones relevantes en este rango de concentración.

En éste, tras subir concentración entre 2 y 13, con bortezomib a 10nM, hubo una muerte celular del 100%. Se subió de 2 a 17 de CFM (para ver si tenía algún efecto adicional más la CFM y reducía el % de CD25) y se añadió bortezomib y nuevamente la muerte celular era prácticamente del 100%.

Tabla 10. Tres experimentos testando ciclofosfamida a distintas concentraciones sola vs ciclofosfamida y bortezomib a distintas concentraciones

Cciclofosfamida 01	CPA µg/mL	Total CD3	Alive CD3+	CD25+	
	CPA	0	42,7	92,28	8,9
		0,5	34,11	90,8	9,2
		1	43,3	93,52	8,56
		2	40,09	90,9	8,8
		3	38,89	90,6	8,86
		5	40,06	91,3	8,8
	BZ (10 nM) + CPA	0	36,5	61,7	7,3
		0,5	36,3	54,9	8,4
		1	33,9	53,7	8
		2	36,6	52,3	8,15
		3	37,06	44,6	7,99
		5	37,02	54,8	7,7

Ciclofosfamida 02	CPA µg/mL	Total CD3	Alive CD3+	CD25+	LT reg
CPA	0	45,25	90	4,42	59,6
	2	35,25	76,8	4,56	74,2
	5	41,4	93,7	4,62	54,7
	7	29,3	93,7	5,97	46,5
	10	30,28	95,8	5,58	48,2
	13	39,26	83,9	3,94	68,8
	BZ (10 nM) + CPA	0	13,45		
		2	19,95		
		5	22,61		
		7	45,3		
		10	21,23		
		13	14,62		

Ciclofosfamida 03	CPA µg/mL	Total CD3	Alive CD3+	CD25+	LT reg
CPA	0	46,4	66,6	6,72	?
	2	46,4	70,6	5,09	

	5	48,2	73,5	6,27
	7	50,4	83,6	6,52
	10	45,4	76,5	8,16
	13	46,03	76,2	6,9
	15	37,17	68,6	6,67
	17	39,3	67,09	7,08
BZ (10 nM) + CPA	0	36,9		
	2	42		
	5	38,4		
	7	41,8		
	10	36,4		
	13	38,7		
	15	32,3		
	17	33,2		

Por último, repetimos el anterior donante A con el receptor y obtuvimos los mismos resultados y, posteriormente con otro donante (donante B) y el mismo receptor pero tampoco se observaron diferencias.

Tabla 11. Repetición de experimento previo y uso de donante alternativo (donante B)

Ciclofosfamida 04		CPA µg/mL	Total CD3	Alive CD3+	CD25+	LT reg
(D_A+R)	CPA	0	36,4	92,7	3,58	87,2
		2	32,2	90,9	3,52	86,5
		5	36,75	94,7	3,27	91,8
		7	28,14	92,1	3,34	91,98
		10	31,5	88,8	3,87	87,8
		13	36,05	93,5	3,81	90,09
		15	35,8	92,36	3,58	89,9
		17	36,4	93,6	3,63	87,13
BZ (10 nM) + CPA		0	18,6	3,02		
		2	23,5	3,03		
		5	19,7	3,33		
		7	21,9	6,87		MUERTO

		10	22,5	7,03		
		13	22,8	4,71		
		15	19,07	3,83		
		17	21,63			

Ciclofosfamida 04 (D_B+R)	CPA	CPA µg/mL	Total CD3	Alive CD3+	CD25+	LT reg
		0	25,4	65,4	7,6	82,5
		2	23,07	68,3	8,7	86,5
		5	13,8	34,6	7,6	84,2
		7	14,4	36,15	7,08	87,1
		10	17,9	35,5	5,25	91,8
		13	12,2	52,8	6,72	86,1
		15	15,5	33,3	7,34	90,2
		17	16,9	47,1	6,16	87,8
	BZ (10 nM) + CPA	0	16,4	1,23		
		2	20,13	7,82		
		5	23,64	3,14		
		7	18,8	2,55		MUERTO
		10	21,75	2,72		
		13	19,4	3,4		
		15	21,84	0,9		
		17	21,23	1,62		

1.6. Monitorización de poblaciones celulares y respuesta inmune postrasplante

Por otro lado, desde el punto de vista biológico se realizó la monitorización de diversas poblaciones celulares así como la recuperación inmune según se había especificado en el protocolo mediante citometría de flujo en diferentes días postrasplante. Para el estudio de recuperación inmune se expusieron los linfocitos del paciente a diversos péptidos virales como el pp65

de CMV con el objetivo de estudiar la activación de dichos linfocitos. En cuanto al estudio de poblaciones celulares, se analizaron porcentajes y número absolutos de células dendríticas, células NK, células T reguladoras y ratio CD4/CD8.

Así, presentamos los análisis de uno de los pacientes (paciente número 1):

Células dendríticas

Observamos la evolución de las CDs globales, cómo aumentaban en los episodios infecciosos así como las CDs monocitoides.

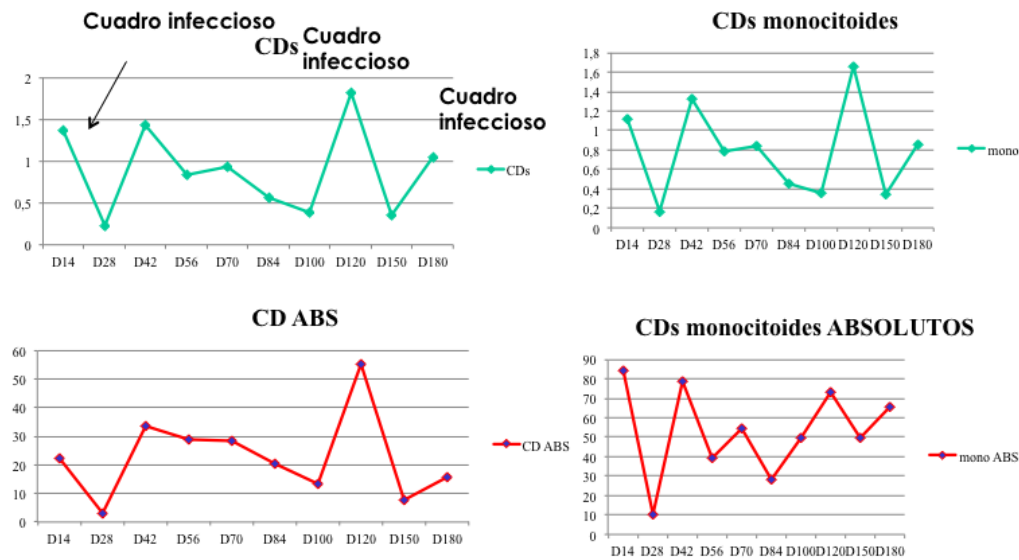


Figura 35. Células dendríticas

Linfocitos totales y subpoblaciones

Del mismo modo, analizamos la evolución de los linfocitos así como la inversión de CD4/CD8 en aproximadamente el día +60 y NK en el día +30. También mostramos el incremento progresivo de los linfocitos T reguladores.

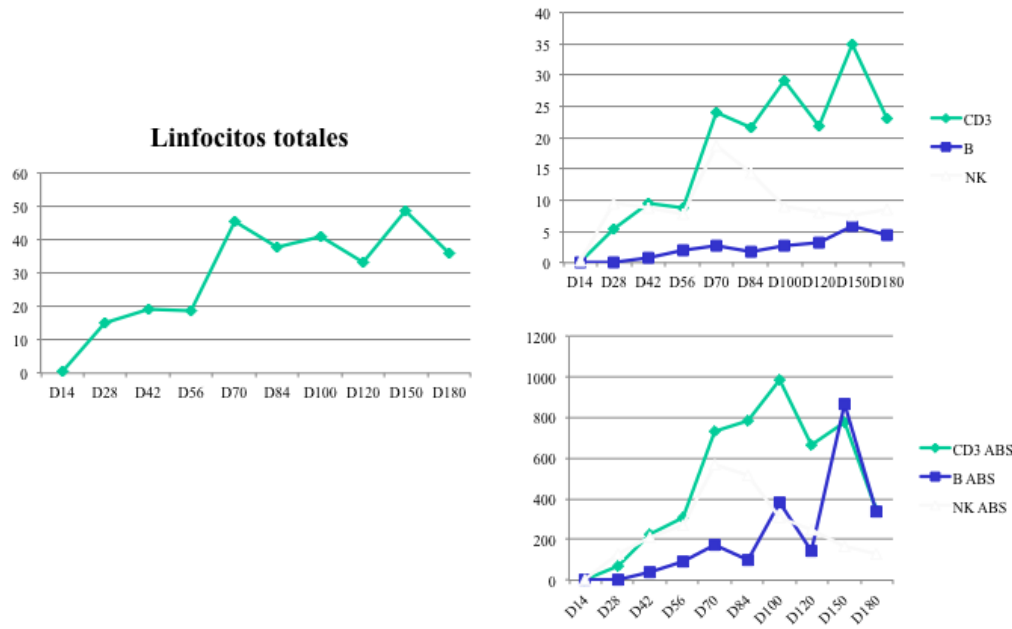


Figura 36. Linfocitos totales y comparación CD3/linfocitos B/NK

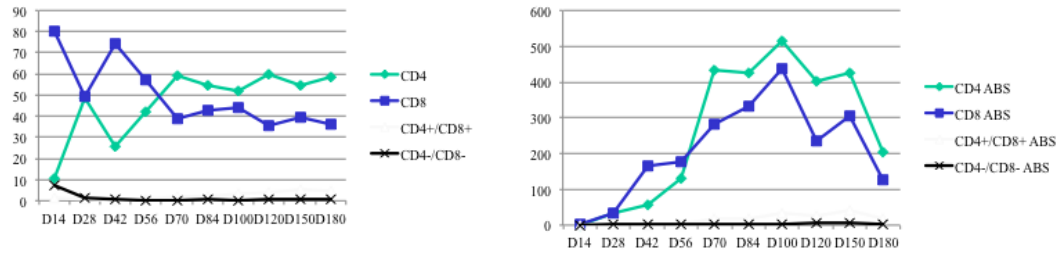


Figura 37. Linfocitos T CD4 y CD8

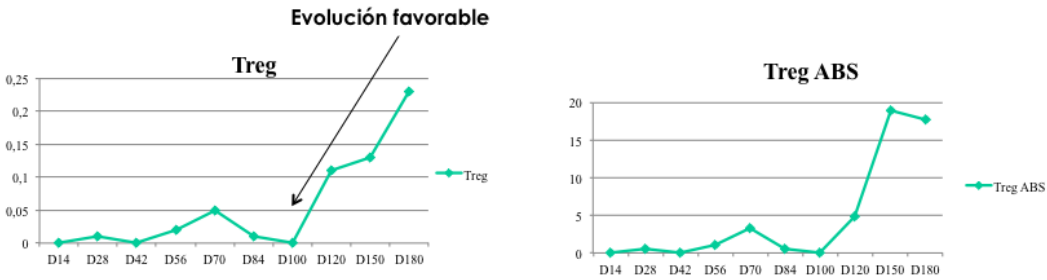


Figura 38. Linfocitos T reguladores

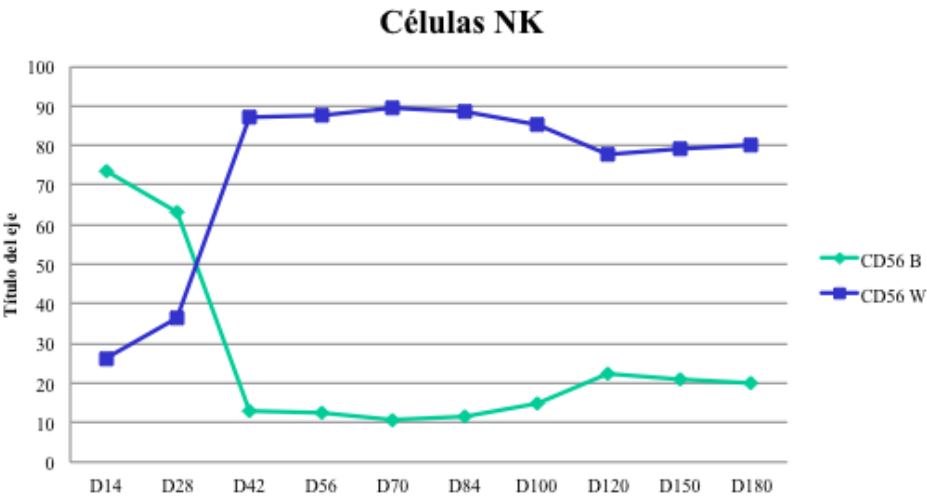


Figura 39. Células NK

Activación linfocitaria

Fueron valorados durante el seguimiento de paciente, incluyendo cuando presentó episodio infeccioso, la INF así como CD40L.

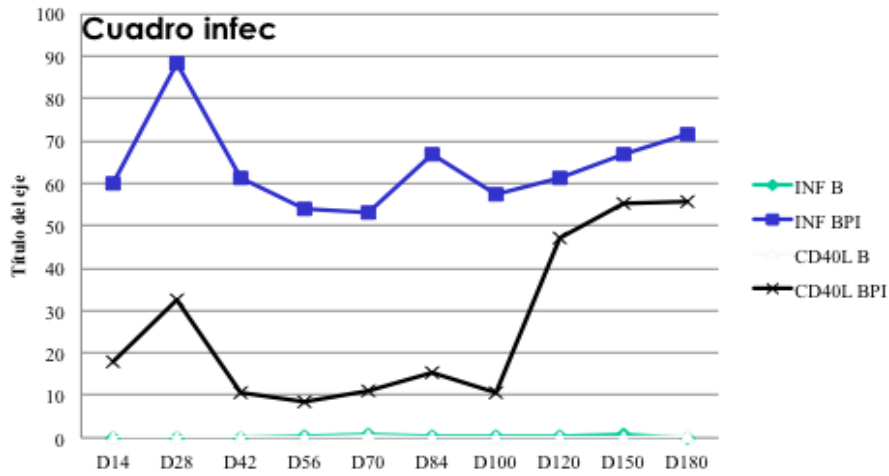


Figura 40. INF y CD40L

Por otro lado, se evaluó la respuesta a citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein Barr (VEB).

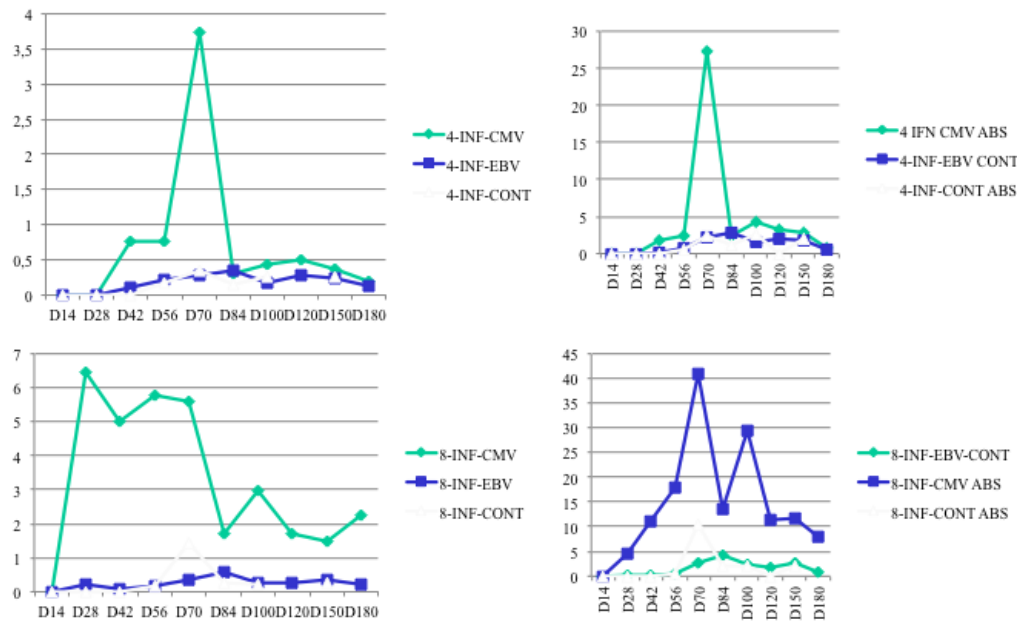


Figura 41. CMV y VEB

2. EN RELACIÓN CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB EMPLEADO IN VIVO EN LA PROFILAXIS DE EICH (*ENSAYO CLINICO EMN*)

2.1. Pacientes

Se incluyeron un total de 25 pacientes (16 hombres: 9 mujeres) en el ensayo clínico fase I entre diciembre de 2011 y diciembre de 2016, siendo el periodo de reclutamiento de 5 años. La mediana de edad fue de 53 años (rango 40-69). Los diagnósticos fueron: mieloma múltiple (n=23) y leucemia de células plasmáticas (n=2), una de ellas con infiltración del sistema nervioso central al trasplante. Los pacientes habían recibido una mediana de líneas de tratamiento al trasplante de 3 (1-5) y un 48% (12/25) presentaba una citogenética de mal pronóstico. Dieciocho (72%) habían recibido trasplante autólogo previo y 12 (48%) presentaban enfermedad extramedular al diagnóstico. Las características basales se reflejan en la Tabla 1 así como por paciente en la Tabla 12.

Tabla 12. Características basales pretrasplante

	N (%)
Edad (mediana / rango)	53 (40-69)
MM	
IgG	16
IgA	3
IgD	1
Bence Jones	2
No secretor	1
LCP	2
Líneas previas de tratamiento	
Número (mediana, rango)	3 (1-5)
1	3
2	2
3	8
4	4
≥5	8
Bz previo	12
IMiD previo	10
TASPE previo (si/no)	18/7
Enfermedad extramedular (si/no)	12/13
Citogenética	
17p	6
T(4,14) u otros reordenamientos IgH	4
Ambas	1
Del 13q	2
T (11,14)	1

Normal	2
Otras / desconocido	9

Tabla 13. Características basales por paciente

	Edad	Sexo	Comorbilidades	Tipo MM	Citogenética	Enfermedad extramedular al diagnóstico	TASPE
0101	52	Mujer	Bocio nodular	IgG-K	Reord IgH	Si (ósea)	Si
0201	53	Hombre	Nefrectomía	IgG-K	Del 17p	Si (ósea, plasmocitomas)	Si
0102	51	Hombre	- Carcinoma basocelular	IgA-K	N/A	No	Si
0202	59	Hombre	- 2 TVP - Osteonecrosis mandibular	BJ-K	t(4;14)	No (plasmocitoma a la recaída)	Si
0203	58	Mujer	Cáncer mama	IgG-K	Normal	No	Si
0103	49	Hombre	- Fractura vertebral L4 (neurocirugía)	IgG-K	N/A	No	No
0104	45	Hombre	- Trastorno distímico	IgG-L	N/A	Si (ósea)	Si
0204	56	Hombre	- Neuropatía periférica	IgG-K	Del 13	Si (ósea)	Si
0205	49	Hombre		IgG-L	Del 17p	Si (plasmocitomas e infiltración SNC)	Si
0206	45	Hombre	- Hipertensión arterial - Obesidad	LCP IgG-K	Del 17p	No	No
0108	60	Mujer		IgG-L	Reord. IgH t(4;14)	No	Si
0109	42	Mujer	Hipotiroidismo	No secretor	Del 17p	Si (ósea)	Si
0209	57	Mujer	- Neuropatía periférica	IgA-L	Normal	Si (plasmocitoma óseo)	Si
0111	66	Mujer	- Enfermedad de Crohn	IgA-K	Del 13	Si (plasmocitoma)	Si
0112	67	Hombre	- Artrosis - EPOC	IgG-K	N/A	Si (plasmocitoma)	No
0114	50	Mujer	- Fibroadenoma	IgD-L	t(11;14)	No	Si

0115	46	Mujer	- Hipotiroidismo	IgG-K	N/A	Si (ósea)	Si
0116	52	Hombre	- Hepatitis	IgG-L	Normal	Si (ósea)	No
0117	61	Hombre	- Hipertensión arterial - Asma bronquial	IgG-K	Del 17p	No	No
0118	53	Hombre	- Hiperuricemia	IgG-K	N/A	No	No
0210	57	Hombre		IgG-K	t(4;14)	No	No
0211	40	Hombre		BJ-L	Unknown partner	No	Si
0213	64	Hombre	Bronquiectasias	IgG-K	Unknown partner	No	Si
0214	69	Mujer	Diabetes mellitus	IgG-L	t(4;14) y Del 17p	No	Si
0215	57	Hombre	- Hipertensión arterial - Hiperlipidemia	LCP No secretor	Del 17p	No	Si

2.2. Datos relacionados con el trasplante

Enfermedad pretrasplante

Únicamente 7 pacientes se trasplantaron en remisión completa (RC), 1 de ellos correspondía a leucemia de células plasmáticas y los 6 restantes habían recibido 2-5 líneas previas para obtener su primera RC.

Fuente de progenitores / donante

Veintitrés recibieron progenitores de sangre periférica, 6 recibieron trasplante de donante no emparentado. La mediana de CD34 infundidas fue de 5.8 (2.5-8.7).

En cuanto a los donantes, presentaban una mediana de edad de 49 años (19-77), siendo 13 hombres y 12 mujeres y en 7 casos hubo disparidad de sexo.

Injerto

Tras el trasplante, todos los pacientes injertaron excepto 2 que no recuperaron cifra de plaquetas. La mediana de injerto de neutrófilos fue de 15 días (2-35) y de plaquetas de 12 (9-174).

Efectos adversos

Las toxicidades precoces, esto es, en los primeros 100 días postrasplante, se resumen en la tabla 3. Gran parte de ellas pueden considerarse esperables durante la fase neutropénica como son la mucositis y la clínica gastrointestinal. Cuatro pacientes fallecieron en los primeros 100 días, 3 debido a infecciones (2 shocks sépticos y 1 neumonía bilateral) y 1 a infarto de miocardio. No se reportaron SAEs relacionados con la medicación.

Tabla 14. Datos relacionados con el trasplante

	N (%)
Estado del MM al trasplante	
RC (IF -/ IF+)	7 (5/2)
RP	14
MBRP	1
EE	1
Progresión	2
EMR pretrasplante (pos/neg)	18/7
Donante	
MRD	19
MURD	5
MMURD	1
Fuente de progenitores (MO/SP)	2/23
Edad donante (mediana / rango)	49 (19-77)
Sexo donante (hombre / mujer)	13/12
Nº células infundidas (mediana / rango)	5.8 (2.5-8.7)
Injerto	
Neutrófilos (si/no)	25/0
- Tiempo hasta recuperación (mediana, rango)	15 (2-35)
Plaquetas (si/no)	23/2
- Tiempo hasta recuperación (mediana, rango)	12 (9-174)
Toxicidad precoz (≤ 100 días)	
Mucositis (1-3)	8
Gastrointestinal (1-3)	12
MAT (1-2)	2

SNC (neuropatía 1-2)	5
EICR aguda	
2-4	3
3-4	1
EICR crónica	
Leve	3
Moderado	4
Severo	1

2.3. EICR aguda y crónica

Los primeros 5 pacientes recibieron tratamiento con Bz y rapamicina y, dada la aparición de EICR grados 2-4 en 5/5 pacientes, se asoció tacrolimus al esquema de profilaxis de EICR siendo estos pacientes con triple profilaxis los evaluables para EICH. Los casos y grados de afectación de EICR aguda y crónica se recogen en la tabla 14.

Con la combinación rapamicina/Bz/tacrolimus, solo 3 pacientes presentaron EICR aguda grado 3 (2 afectación gastrointestinal y 1 cutánea) para una incidencia acumulada de grados 2-4 del 35% (IC-95%: 15-55%) y 3-4 del 10% (IC-95%: 1-27%).

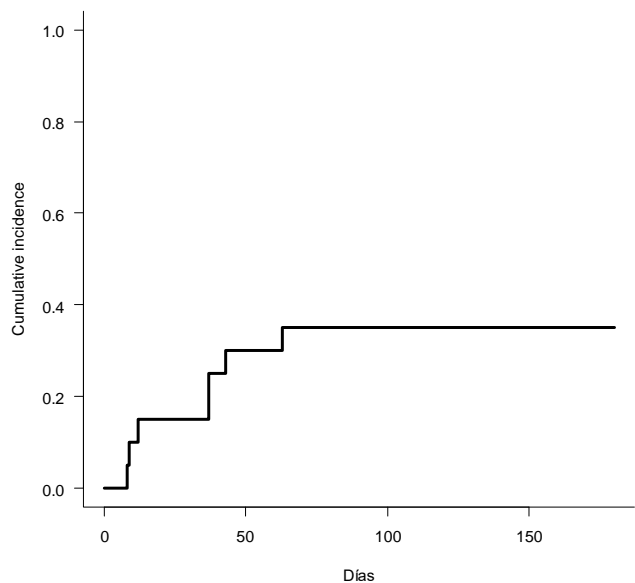


Figura 42. EICR aguda grados 2-4

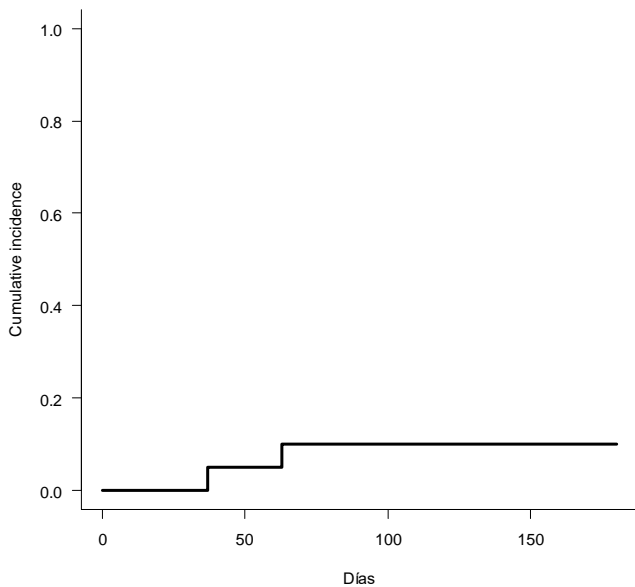


Figura 43. EICR aguda grados 3-4

Por otro lado, 8 pacientes presentaron EICR crónica: 3 formas leves (boca); 4 moderadas (piel), 3 remisión completa y 1 respuesta parcial con tratamiento de primera línea con corticoides y 1 forma severa que precisó hasta 4 líneas de tratamiento. La incidencia acumulada de EICR crónica fue del 17% (IC-95%: 4-39%).

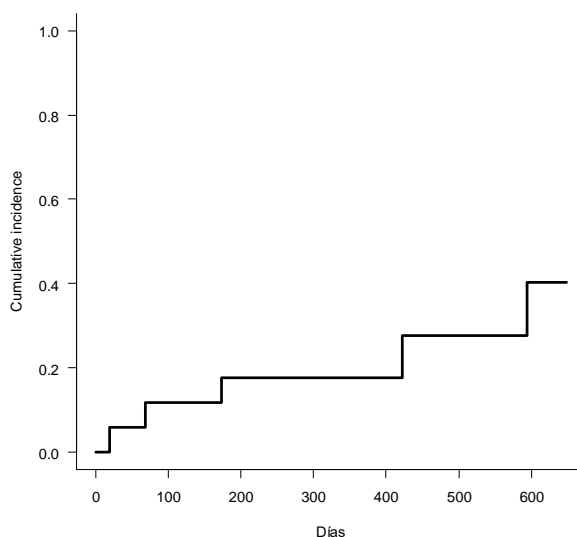


Figura 44. EICR crónica

Los datos pre y postrasplante por paciente en la tabla 4.

2.4. Evolución postrasplante

De los 21 pacientes analizables a día +100, 14 estaban en RC (67%), 1 en MBRP (4%) y 4 (19%) en RP. La MnRR fue de 16% al año postrasplante mientras que la MRR del 13.5%.

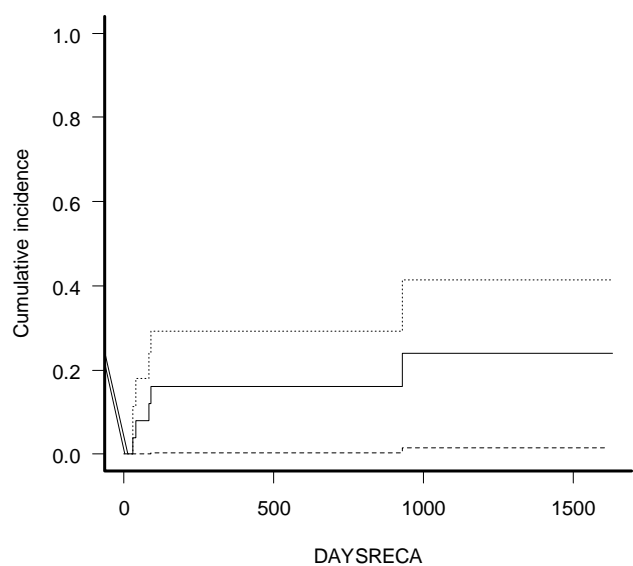


Figura 45. Mortalidad no relacionada con la recaída (MnRR)

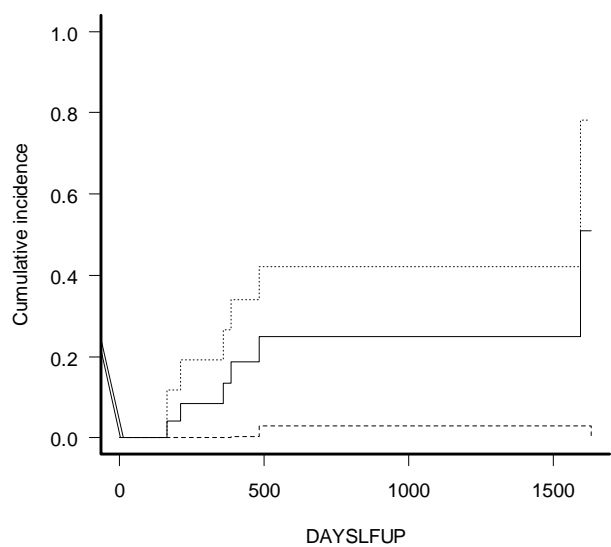


Figura 46. Mortalidad relacionada con la recaída (MRR)

La mediana de SG fue de 30.5 meses (22-39) y la SLE de 16 meses (18-23.5). La mediana de SLP entre los que alcanzaron CR tras trasplante fue de 15 (11.5-18) y la SLR entre los que alcanzaron al menos RP de 12.5 meses (2-23) respectivamente.

Con una mediana de seguimiento (pacientes vivos) de 21.3 meses (IC-95%: 7.7-34.9), la SG a 2 años era del 60%, la SLE del 24%, la SLP del 21% y la SLR del 23.6%.

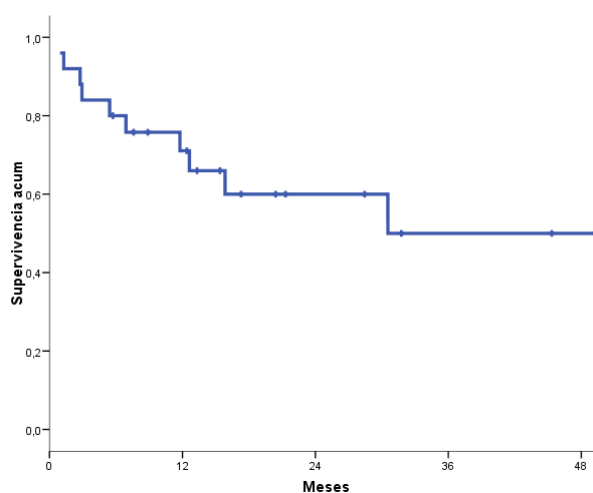


Figura 47. Supervivencia global (SG)

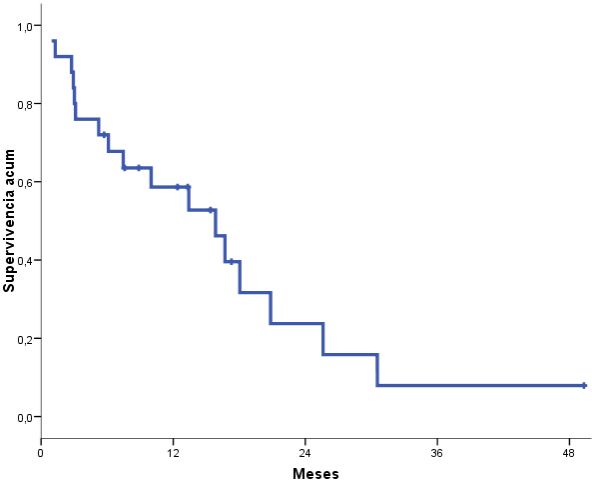


Figura 48. Supervivencia libre de evento (SLE)

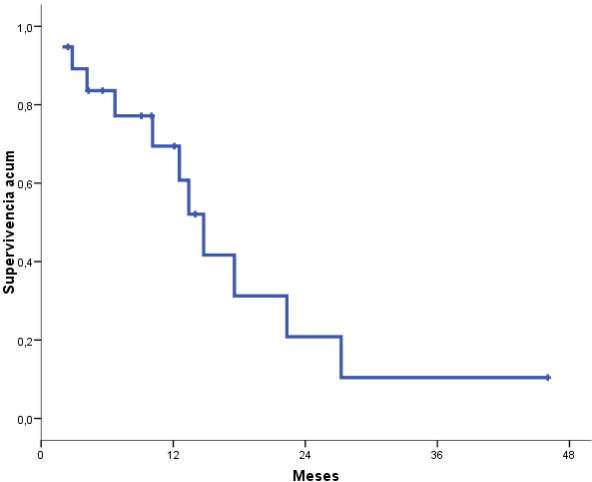


Figura 49. Supervivencia libre de progresión (SLP)

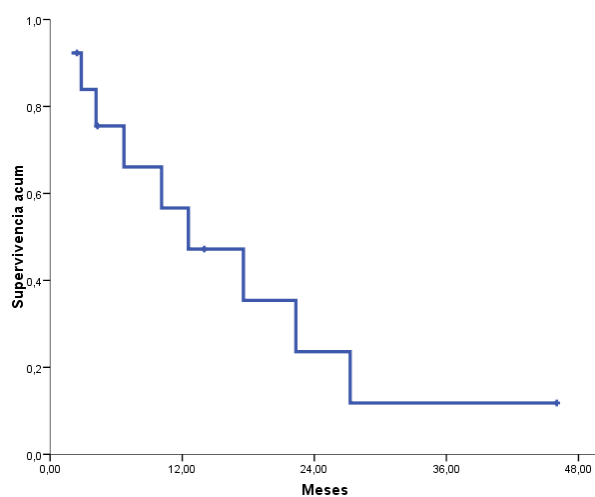


Figura 50. Supervivencia libre de recaída (SLR)

A fecha de último seguimiento, 14 pacientes (56%) están vivos (10 en RC, 1 RP, 1 con enfermedad estable, 1 en progresión y 1 en recaída) y 7 fueron éxitos, 5 por su enfermedad de base.

Tabla 15. Datos pre y postrasplante

	N. líneas	Estado al trasplante	Respuesta día +100	Recaída	EICR aguda	MRT	Fecha último seguimiento
0101	4	RP	MBRP	Si (>12 m)	Gr2	No	52 m, éxitus
0201	5	RP	N/E	No	Gr4	Si	2 m, éxitus
0102	3	RP	RC	No	Gr2	No	60 m, vivo
0202	>5	Progresión	RC	Si (3 m)	Gr3	No	7 m, éxitus
0203	3	RC	RC	Si (IF+: 10 m)	Gr2	No	60 m, vivo
0103	3	RP	RC	No	No	No	37 m, éxitus
0104	4	RP	RC	Si (>12 m)	No	No	51 m, éxitus
0204	3	RP	RC	Si (+5 m)	Gr2	No	5 m, éxitus
0205	2	RP	RP	Si (+3 m)	No	No	13 m, éxitus
0206	1	RC	RC	Si (>24 m)	Gr1	No	32 m, vivo
0108	4	Progresión	N/E	No	No	Si	1 m, éxitus
0109	1	MBRP	RC	Si (>12 m)	No	No	28 m, vivo
0209	5	RC	RC	Si (+7 m)	Gr2	No	13 m, éxitus
0111	5	RC	N/E	N/E	No	Si	3 m, éxitus
0112	3	RC	RC	N/E	No	Si	3 m, éxitus
0114	>5	RP	RC	Si (>12 m)	Gr3	No	25 m, vivo
0115	5	RP	RC	No	No	No	20 m, vivo
0116	>5	RP	RP	No	Gr1	No	20 m, vivo
0117	2	RP	RP	Si (+6 m)	No	No	13 m, vivo
0118	3	RC	RC	No	Gr3	No	8 m, vivo
0210	3	RP	RC	Si (+6 m)	No	Si	16 m, éxitus
0211	>5	EE	RP	Si (>12 m)	No	No	20 m, vivo
0213	4	RP	RP	No	Gr2	No	18 m, vivo
0214	3	RP	RP	No	Gr1	No	9 m, vivo
0215	1	RC	RC	No	Gr1	No	8 m, vivo

2.5. Estudios de inmunofenotipo

2.5.1. Poblaciones de granulocitos, monocitos y DCs

2.5.1.1. Estudio de granulocitos neutrófilos, eosinófilos y basófilos

Se llevó a cabo una monitorización de los porcentajes de dichas poblaciones en sangre periférica identificadas por citometría de flujo tanto en nuestros pacientes como en la cohorte sana. Únicamente destaca una mejor

proporción de basófilos en los pacientes frente a la cohorte de sanos en los días +270 y 365. En la tabla resumen 16 se resumen dichos datos.

Tabla 16. Porcentajes de granulocitos y monocitos

Media(SEM)	SANOS	EMN
%Neutrofilos	52,10(8,76)	
<i>Día +100</i>		<i>63,42(5,10)</i>
<i>Día +180</i>		<i>58,49(4,33)</i>
<i>Día +270</i>		<i>59,53(3,56)</i>
<i>Día +365</i>		<i>59,40(4,340)</i>
%Monocitos	5,20(0,70)	
<i>Día +100</i>		<i>7,10(1,08)</i>
<i>Día +180</i>		<i>7,51(0,67)</i>
<i>Día +270</i>		<i>7,27(0,92)</i>
<i>Día +365</i>		<i>5,43(1,16)</i>
%Eosinófilos	1.08(0.24)	
<i>Día +100</i>		<i>2.08(0.47)</i>
<i>Día +180</i>		<i>2.29(0.77)</i>
<i>Día +270</i>		<i>2.32(0.55)</i>
<i>Día +365</i>		<i>3.61(0.84)</i>
%Basófilos	0.84(0.14)	
<i>Día +100</i>		<i>0.47(0.84)</i>
<i>Día +180</i>		<i>0.38(0.12)[#]</i>
<i>Día +270</i>		<i>0.38(0.07)[#]</i>
<i>Día +365</i>		<i>0.46(0.07)</i>

2.5.1.2. Estudio de DCs

En la tabla 17 se resumen los porcentajes de los diferentes subtipos de DCs en sangre periférica, tanto en los pacientes trasplantados a partir del día

+100 como en un grupo de sujetos sanos. Tal como queda reflejado, se registraron diferencias significativas con los controles sanos, siendo el porcentaje de DCs plasmocitoides significativamente inferior en los pacientes a partir del día +180 postrasplante (Figura 51).

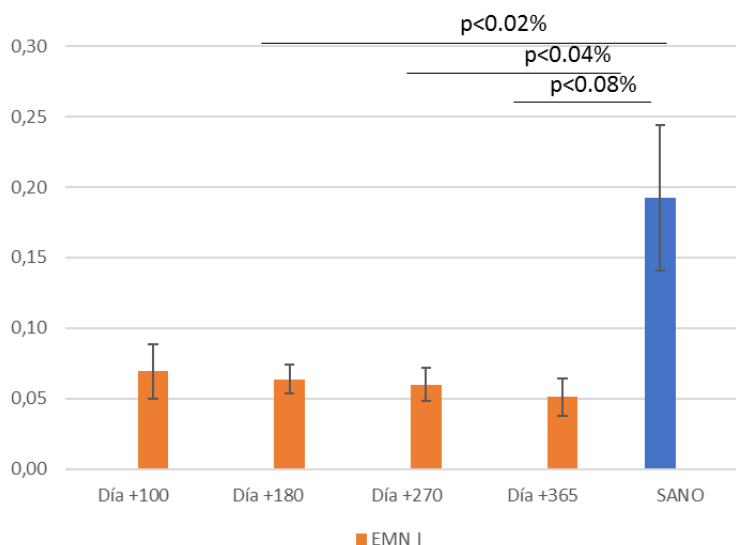


Figura 51. Porcentaje de células dendríticas plasmocitoides

Tabla 17. Medias y error estándar de las poblaciones de CDs

Media(SEM)	SANOS	EMN
%DCs Plasmocitoides	0,19(0,05)	
<i>Día +100</i>		0,07(0,02)
<i>Día +180</i>		0,06(0,01) [#]
<i>Día +270</i>		0,06(0,01) [#]
<i>Día +365</i>		0,05(0,01) [#]
%DCs Mieloides BDCA+	0,19(0,06)	
<i>Día +100</i>		0,13(0,04)
<i>Día +180</i>		0,13(0,02)
<i>Día +270</i>		0,14(0,03)
<i>Día +365</i>		0,11(0,03)
%DCs Monocitoides	0,89(0,16)	
<i>Día +100</i>		1,68(0,38)
<i>Día +180</i>		0,89(0,25)
<i>Día +270</i>		1,46(0,28)
<i>Día +365</i>		0,67(0,17)

SEM: error estándar de la media [#]Diferencias significativas entre pacientes y sujetos sanos (p<0.05).

La expresión de CD86 como marcador de activación no mostró diferencias significativas en ninguna de las subpoblaciones de DCs estudiadas.

2.5.2. Distribución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias

2.5.2.1. Linfocitos B y T

Con la combinación de anticuerpos seleccionada para determinar las subpoblaciones linfocitarias comprobamos que los pacientes mantenían una linfopenia en comparación con los sujetos sanos (figura 52); así mismo se

observaba un menor porcentaje de CD4+ en la distribución de los linfocitos T frente a los CD8 (figura 53). Destacaba también la falta de recuperación de la población B en los pacientes sometidos a trasplante siendo todavía significativamente inferior desde el día +100 hasta el día +365 frente a la cohorte de sujetos sanos (figura 54).

En la tabla 18 se muestran los diferentes porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias sin observarse diferencias significativas en los linfocitos CD4-CD8- y células NK.

Tabla 18. Porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias

Media(SEM)	SANOS	EMN
%Linfocitos	37,75(8,35)	
<i>Día +100</i>		20,46(4,24) [#]
<i>Día +180</i>		24,02(3,53) [#]
<i>Día +270</i>		25,22(2,85)
<i>Día +365</i>		21,65(3,30) [#]
%Linfocitos T	27,31(5,47)	
<i>Día +100</i>		16,26(3,88)
<i>Día +180</i>		27,31(5,47)
<i>Día +270</i>		21,51(2,77)
<i>Día +365</i>		17,63(3,29)
%CD4+ respecto a los T	59,53(2,26)	
<i>Día +100</i>		44,56(4,46)
<i>Día +180</i>		39,82(3,73) [#]
<i>Día +270</i>		42,50(5,25)
<i>Día +365</i>		42,86(5,57) [#]
%CD8+ respecto a los T	32,86(3,22)	
<i>Día +100</i>		45,40(4,71)
<i>Día +180</i>		53,71(3,63) [#]
<i>Día +270</i>		51,30(5,60) [#]
<i>Día +365</i>		50,64(5,34)
%CD4-CD8- respecto a los T	4,56(1,00)	
<i>Día +100</i>		9,06(2,91)
<i>Día +180</i>		5,15(1,16)
<i>Día +270</i>		4,58(0,94)
<i>Día +365</i>		4,66(1,44)
% CD4+CD8+ respecto a los T	3,05(1,09)	
<i>Día +100</i>		1,25(0,36) [#]
<i>Día +180</i>		1,25(0,30)
<i>Día +270</i>		1,38(0,36)
<i>Día +365</i>		1,75(0,50)
% Células NK	6,36(1,89)	
<i>Día +100</i>		3,66(0,53)

Día +180	3,32(0,50)
Día +270	2,90(0,51)
Día +365	2,86(0,66)
% Linfocitos B	4,08(1,17)
Día +100	0,55(0,20) #
Día +180	1,68(0,54)
Día +270	1,09(0,31) #
Día +365	1,15(0,23) #

SEM: error estándar de la media #Diferencias significativas entre pacientes y sujetos sanos ($p<0.05$).

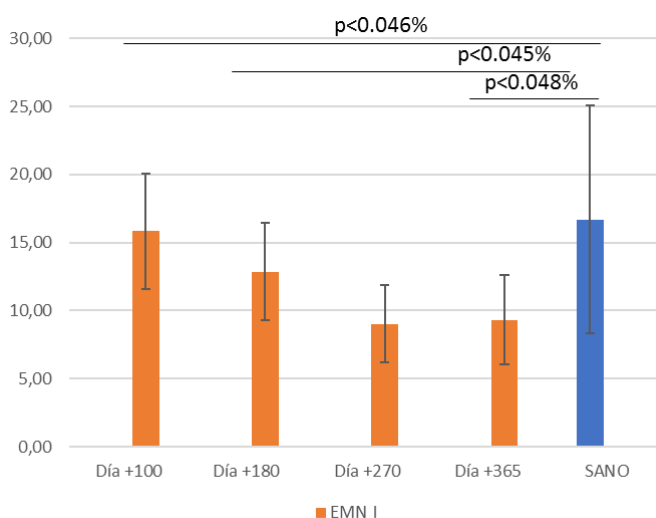


Figura 52. Porcentaje de los linfocitos

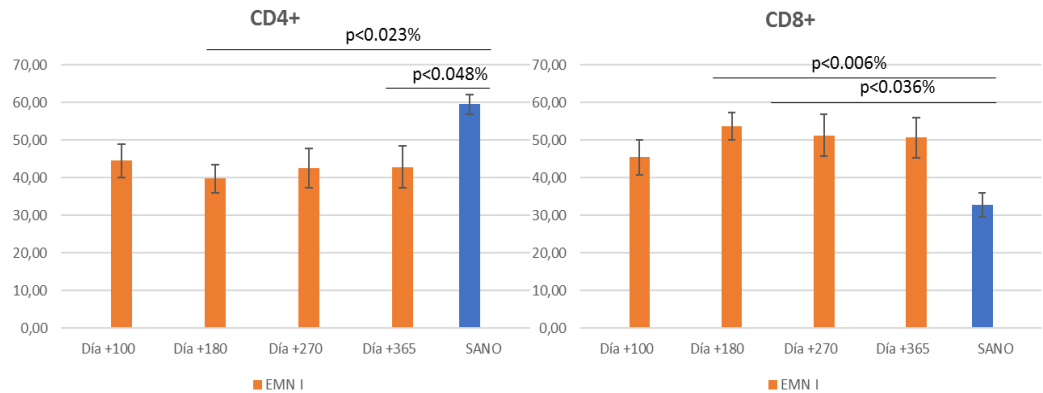


Figura 53. Distribución de linfocitos T CD4 y CD8

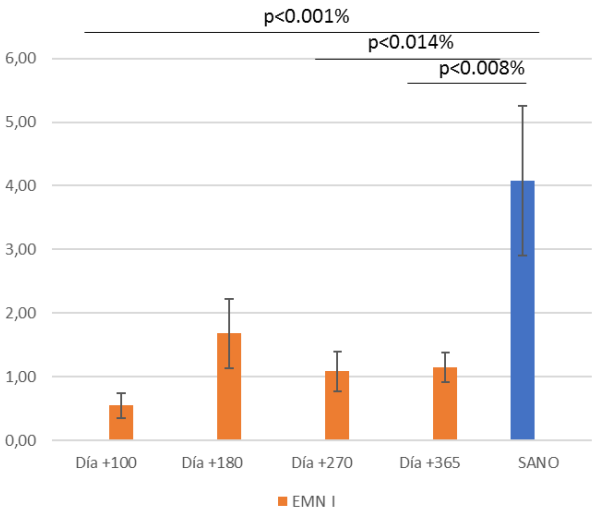


Figura 54. Porcentaje de los linfocitos B

2.5.2.2. Linfocitos T naïve/memoria/efector

De acuerdo con la expresión de CD45RA y CCR7 separamos cuatro grupos de linfocitos T tanto CD4 como CD8:

-
- Naive: CD45RA+ CCR7+
 - Efector: CD45RA+ CCR7-
 - Memoria central CD45RA-CCR7+
 - Memoria periférica CD45RA-CCR7-

Como se objetiva en la Figura 55, los linfocitos T CD4+ naive estaban significativamente disminuidos en los días +100 y 180, así como los CD4+ memoria central desde el día +100 al 270, sin embargo era mayor en este grupo los linfocitos CD4 memoria periférica en todos los momentos estudiados (desde el +100 al +365). En la tabla 19 se resume la distribución de los linfocitos T CD4.

Tabla 19. Distribución de los linfocitos T CD4 naïve/memoria/efector

Media(SEM)	SANOS	EMN
CD4 Naïve	36,67(4,13)	
<i>Día +100</i>		22,99(2,57) [#]
<i>Día +180</i>		18,29(2,64) [#]
<i>Día +270</i>		23,52(3,40)
<i>Día +365</i>		23,91(4,95)
CD4 efector	1,78(1,20)	
<i>Día +100</i>		3,90(1,14)
<i>Día +180</i>		4,84(1,33)
<i>Día +270</i>		8,38(2,79)
<i>Día +365</i>		4,72(1,97)
CD4 memoria central	46,17(2,31)	
<i>Día +100</i>		31,47(3,01) [#]
<i>Día +180</i>		32,79(2,88) [#]
<i>Día +270</i>		32,28(3,68) [#]
<i>Día +365</i>		36,65(4,00)
CD4 memoria periférica	15,38(2,54)	
<i>Día +100</i>		41,64(4,25) [#]
<i>Día +180</i>		44,07(3,65) [#]
<i>Día +270</i>		35,82(3,69) [#]
<i>Día +365</i>		34,72(5,26) [#]

SEM: error estándar de la media [#]Diferencias significativas entre pacientes y sujetos sanos (p<0.05).

Respecto a los linfocitos CD8+, esta alteración en la distribución es menos llamativo, destacando fundamentalmente un menor número de linfocitos CD8 memoria central en los días +100 y +180 en los pacientes no encontrándose diferencias posteriormente (tabla 20).

Tabla 20. Distribución de los linfocitos T CD8 naive/memoria/efector

Media(SEM)	SANOS	EMN
CD8 Naïve	23,68(6,01)	
<i>Día +100</i>		13,12(4,00)
<i>Día +180</i>		13,57(4,55)
<i>Día +270</i>		20,87(5,87)
<i>Día +365</i>		21,47(6,79)
CD8 efector	36,40(7,96)	
<i>Día +100</i>		44,8(5,03)
<i>Día +180</i>		48,24(6,31)
<i>Día +270</i>		48,90(8,44)
<i>Día +365</i>		44,49(9,41)
CD8 memoria central	11,67(1,89)	
<i>Día +100</i>		5,02(1,09) #
<i>Día +180</i>		5,76(1,43) #
<i>Día +270</i>		6,59(1,49)
<i>Día +365</i>		7,43(2,19)
CD8 memoria periférica	28,25(1,30)	
<i>Día +100</i>		37,17(4,06)
<i>Día +180</i>		32,44(4,76)
<i>Día +270</i>		23,64(3,82)
<i>Día +365</i>		26,61(6,32)

SEM: error estándar de la media #Diferencias significativas entre pacientes y sujetos sanos ($p < 0.05$).

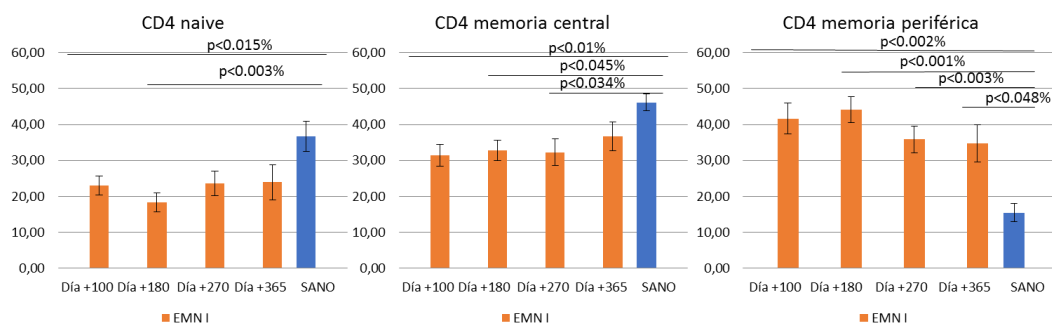


Figura 55. Linfocitos CD4+ naive/memoria

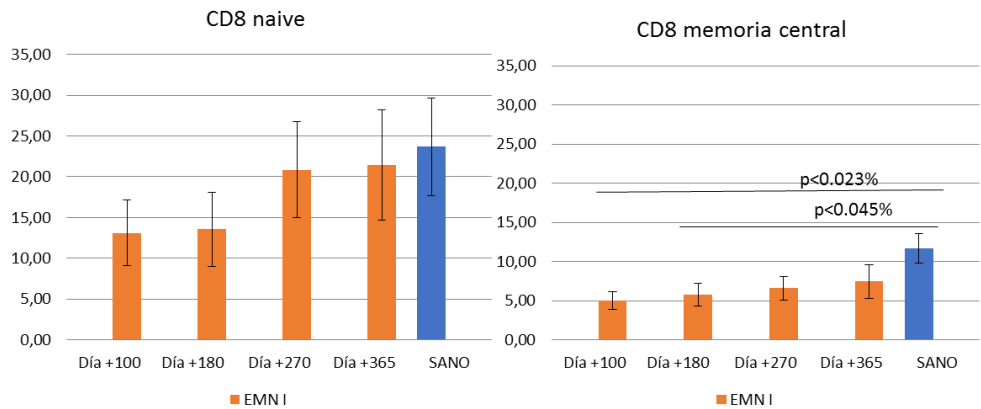


Figura 56. Linfocitos CD8+ naive/memoria

2.5.2.3. Linfocitos T reguladores

La cantidad de linfocitos T reguladores (CD4+CD25+CD127+/-dim Foxp3+) fue similar en ambos grupos (tabla 21).

Tabla 21. Porcentaje y número de linfocitos T reguladores

Media(SEM)	SANOS	EMN
%Treg	0,07(0,02)	
Día +100		0,19(0,07)
Día +180		0,23(0,06)
Día +270		0,20(0,04)
Día +365		0,27(0,08)

SEM: error estándar de la media

2.5.2.4. Células NK

No se observaron diferencias en los porcentajes de células NK. Sin embargo, se apreciaron diferencias entre los sujetos sanos y los pacientes en los que se refiere a las subpoblaciones de células NK CD56+ “bright” y “weak”, tal como se representa en la tabla 22; en este sentido, observamos un mayor porcentaje estadísticamente significativo de células CD56 “bright” en los pacientes con respecto a los sujetos sanos en los días +270 y +365.

Tabla 22. Subpoblaciones de células NK

Media(SEM)	SANOS	EMN
%CD56 BRIGHT	5,35(1,24)	
Día +100		15,54(2,95)
Día +180		12,44(2,00)
Día +270		13,41(1,93) [#]
Día +365		16,57(4,60) [#]
%CD56 WEAK	94,65(1,24)	
Día +100		84,46(2,95)
Día +180		87,59(1,99)
Día +270		86,59(1,93) [#]
Día +365		83,48(4,61) [#]

SEM: error estándar de la media [#]Diferencias significativas entre pacientes y sujetos sanos (p<0.05).

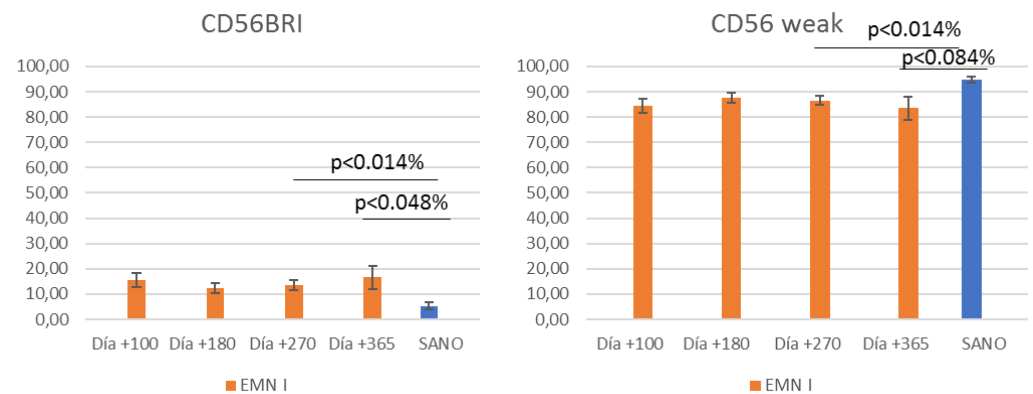


Figura 57. Células NK bright/weak

Se caracterizan por expresar un menor porcentaje de NK CD16+ siendo este marcador más característico de las weak y mayor % NK CD94+, este más intenso en las bright.

Tabla 23. Porcentaje de células NK+ para CD16 y CD94

Media(SEM)	SANOS	EMN
%CD94	53,25(5,68)	
Día +100		72,63(2,95) [#]
Día +180		70,12(2,00)
Día +270		69,79(5,49)
Día +365		71,17(6,51)
%CD16	92,12(1,08)	
Día +100		83,59(2,14) [#]
Día +180		81,66(2,49) [#]
Día +270		74,97(8,21) [#]
Día +365		73,83(6,24) [#]

SEM: error estándar de la media [#]Diferencias significativas entre pacientes y sujetos sanos (p<0.05).

Respecto a los KIR estudiados en las células NK no se observan grandes diferencias como se puede ver en la tabla resumen 24.

Tabla 24. Porcentaje de células NK+ CD158a, CD161, NK

Media(SEM)	SANOS	EMN
%NK CD158a	32,39(5,76)	
<i>Día +100</i>		32,69(5,98)
<i>Día +180</i>		31,07(6,11)
<i>Día +270</i>		27,26(7,33)
<i>Día +365</i>		25,69(8,85)
%NK CD161	76,54(5,19)	
<i>Día +100</i>		56,06(5,27) [#]
<i>Día +180</i>		60,92(4,55)
<i>Día +270</i>		63,28(5,71)
<i>Día +365</i>		67,05(6,27)
% NKB1	19,50(5,13)	
<i>Día +100</i>		20,10(3,07)
<i>Día +180</i>		14,97(2,27)
<i>Día +270</i>		12,17(2,54)
<i>Día +365</i>		11,38(0,97) [#]
% NKAT	35,94(5,53)	
<i>Día +100</i>		31,86(2,93)
<i>Día +180</i>		35,22(3,79)
<i>Día +270</i>		33,10(4,28)
<i>Día +365</i>		30,43(5,91)

2.5.3. Activación linfocitaria

Centrando el análisis en la expresión de CD40L, se encontraron niveles disminuidos de CD40L en los pacientes con respecto a los sujetos sanos en los

días +100, +180 y +270 postrasplante, tal como queda reflejado en la figura 58 y tabla 25.

En lo que se refiere a la expresión intracelular de interferón, en el grupo de pacientes los niveles de IFN estaban significativamente aumentados en el día +180 y +270 postrasplante (figura 58 y tabla 25).

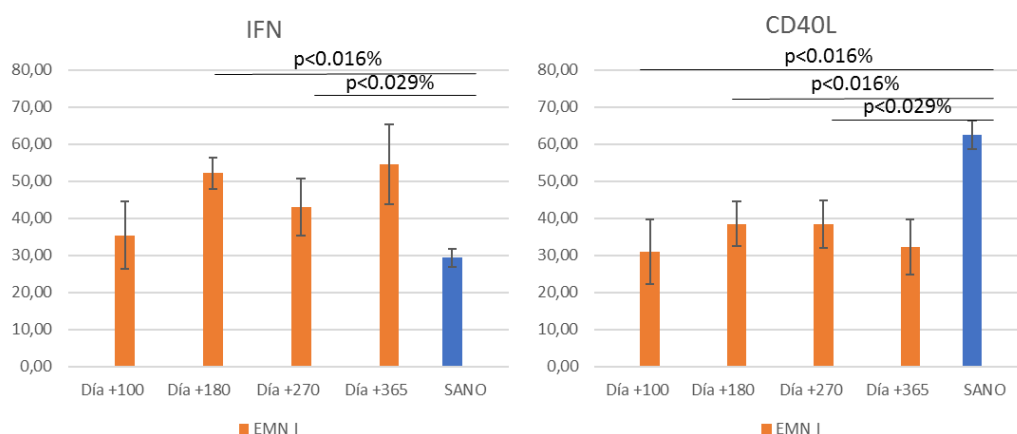


Figura 58. IFN y CD40L intracitoplasmático

Tabla 25. Niveles de IFN y CD40L intracitoplasmático

Media(SEM)	SANOS	EMN
CD40L	62,56(3,78)	
Día +100		30,97(8,76) #
Día +180		38,49(6) #
Día +270		38,44(6,51) #
Día +365		32,27(7,38)
IFN	29,32(2,49)	
Día +100		35,34(9,1)
Día +180		52,2(4,25) #
Día +270		43(7,78) #
Día +365		54,62(10,86)

SEM: error estándar de la media #Diferencias significativas entre pacientes y sujetos sanos ($p<0.05$).

2.6. Quimerismo en linfocitos B de memoria CD27+

En las muestras de sangre periférica de los pacientes del de Hospital Virgen del Rocío se llevó a cabo una separación inmunomagnética de los linfocitos B virgen frente a los de memoria según la expresión de CD27. En ambas poblaciones enriquecidas realizó un estudio de quimerismo. En la tabla 26 pueden observarse de los resultados obtenidos, en donde destaca un mayor índice de positividad en los linfocitos B de memoria. De los 4 pacientes de los que se dispone información de quimerismo y además recayeron (resaltados los datos en negrita) se observa que dos de ellos empezaron a incrementar el % de células pertenecientes al receptor fundamentalmente en la población enriquecida de linfocitos B de memoria CD27+.

Tabla 26. Quimerismo en linfocitos B de memoria CD27+

		LINFOCITOS B VIRGEN	LINFOCITOS B MEMORIA	GLOBAL
101	Día +100	0	0	1
	Día +180	0	0	0,5
	Día +270	0	0	0,2
	Día +365	0,12	0	1,21
102	Día +100	0	0	0
	Día +180	0	0	0
	Día +270	0	0,2	0,2
	Día +365	0	0	0
103	Día +100	0	0	0
	Día +180	0	0,13	0
	Día +270	0	0	0
	Día +365	0,8	0	0
104	Día +100			
	Día +180	0	0,03	0
	Día +270	0	0	0
	Día +365	0	0	0
114	Día +100			
	Día +180			
	Día +270	0,13	1,3	
	Día +365	0	0,97	
115	Día +100	0	0,6	0
	Día +180	0	0,03	0
	Día +270	0	0	0
	Día +365			
116	Día +100	0,13	0,52	0,52
	Día +180	0	0	0
	Día +270	0	0	0
	Día +365	0,1	0,1	0,1
117	Día +100	0	3	0,3
	Día +180	0,18	0,33	0,75
	Día +270	1,7	4,3	
	Día +365			
118	Día +100	0	0	0
	Día +180	0	0	0
	Día +270	0	1,1	0,45

DISCUSIÓN

A pesar de los avances en el campo del trasplante y la inmunoterapia, la EICR continúa siendo la principal causa de morbilidad tras el trasplante. De hecho, hoy en día aún no disponemos de ningún procedimiento que separe EICL de EICR. La depleción de linfocitos del donante T es una estrategia eficaz pero, si bien disminuye el riesgo de EICR, implica un mayor riesgo de recaída y de infecciones graves dada la inmunosupresión a la que es sometida el paciente [236].

La depleción *ex vivo* de linfocitos T del injerto mediante selección positiva de CD34 ha sido uno de los métodos más empleados. Fármacos como alentuzumab o especialmente timoglobulina, se han evaluado en diversos ensayos clínicos confirmándose su eficacia en términos de reducción de la EICR, si bien en ninguno de los estudios prospectivos randomizados se ha evidenciado un efecto positivo sobre la supervivencia global [192].

Con el fin de obtener una depleción más selectiva de linfocitos T aloreactivos, diversos estudios han descrito diferentes procedimientos de alodepleción *in vitro*, aproximación que teóricamente mantendría una respuesta inmune antitumoral y frente a patógenos adecuada tras el trasplantes.

En base a que en el proceso de activación linfocitaria intervienen vías de señalización que convergen en factores de transcripción como Nf-kB, clave en la regulación de la respuesta immune y, que el proteosoma a su vez degrada el inhibidor de NF-kB [204, 205], nuestro grupo describió por primera vez que el bortezomib permitiría generar un efecto proapoptótico muy selectivo frente a linfocitos T aloreactivos. Así, tras un cultivo mixto de linfocitos, el bortezomib preserva la viabilidad de los linfocitos en reposo manteniendo la respuesta immune frente a patógenos o, potencialmente, frente a la leucemia/tumor [212,213, 214]. Estos hallazgos se han trasladado a la clínica, de manera que algunos estudios han evaluado la eficacia de bortezomib dentro del esquema de profilaxis de EICR [216, 217].

En el presente trabajo de tesis, hemos continuado esta línea de investigación analizando cuáles son las mejores condiciones de cultivo para generar la alodeplección más intensa preservando al máximo la viabilidad de los linfocitos en reposo. En primer lugar, confirmamos que la proporción óptima de linfocitos efectores : estimuladores para conseguir la máxima activación de linfocitos aloreactivos en el cultivo mixto fue 3:1. Para ello empleamos diferentes proporciones y evaluamos la activación linfocitaria con los marcadores de activación CD25 y CD69. En relación con las células estimuladoras, también llevamos a cabo estudios para confirmar cuál es la población que permite la máxima activación de células efectoras. En este sentido, y dado que los

linfocitos T no actúan como células presentadoras de antígeno salvo en condiciones muy concretas de activación, evaluamos si la depleción de linfocitos T de la fracción de células estimuladoras permitía una mayor activación de células efectoras y, efectivamente, la depleción T permitió optimizar el procedimiento. Además, testamos distintas concentraciones de bortezomib, desde 1 a 1000 nM, encontrando los mejores resultados a 10 - 12 nM. A continuación, comprobamos si el proceso de congelación o descongelación en bolsa afecta a la viabilidad celular del producto alodepleccionado, aspecto importante para poder trabajar a nivel clínico utilizando dicho producto en el momento más conveniente según la evolución del paciente. Constatamos que el proceso de congelación / descongelación no afectó la viabilidad linfocitaria.

Otros grupos han empleado distintos procedimientos con el fin de generar una alodeplección in vitro, por ejemplo, empleando anticuerpos monoclonales; así Solomon et al emplearon antiCD25 unido a una inmunotoxina, que añadieron al cultivo mixto de linfocitos de donante y receptor. Infundieron este producto en una serie de 16 pacientes en los que la incidencia de EICR aguda fue del 46% en grados 2-4 y del 12% en grados 3-4, lo que realmente no está por debajo de lo esperado empleando estrategias estándar de EICR. Estos datos podrían explicarse en base a que CD25 también se expresa en los linfocitos T reguladores, clave en el mantenimiento de la

homeostasis postrasplante [245], de manera que mediante este procedimiento también podría estarse produciendo una alodeplección de linfocitos T reguladores. También se ha empleado antiCD137 por Wehler y cols que, observaron en 15 procedimientos de alodeplección *in vitro* que la frecuencia de linfocitos alorreactivos se reducía una mediana de 9.5% comparado con otras poblaciones no deplecionadas, manteniendo además la respuesta antitumoral y antiviral de los linfocitos T.. Según estos autores, la expansión *in vitro* de linfocitos T reactivos frente a tumores seguidos de alodeplección mediante CD137 podría potenciar la eficacia antitumoral de los injertos con un riesgo menor de producir EICR [247].

Otro procedimiento de alodeplección *in vitro* fue desarrollado inicialmente por Perruccio et al [248]. Estos investigadores describen que tras un cultivo mixto de linfocitos, los linfocitos alorreactivos no expresan el gen de la resistencia a multidrogas (MDR) y por tanto no expresan en su membrana la P-glicoproteína (P-gp) responsable de expulsar fuera de la célula compuestos tóxicos, a diferencia de los linfocitos T en reposo que sí expresan P-gp. Entre los compuestos que son sustrato de esta bomba de membrana está la 4,5 dibromorodamina..

Basándose en esta tecnología Roy et al (EBMT 2016) plantean un ensayo multicéntrico fase II, basado en la administración de ATIR101, producto de linfocitos T alodeplecionados de células alorreactivas mediante el uso de un

tratamiento fotodinámico en pacientes con hemopatías malignas sometidos a trasplante haploidéntico con selección de CD34 (Clinimacs®). No se emplea ningún tratamiento inmunosupresor postrasplante como profilaxis de EICR. Con el fin de acelerar la reconstitución inmune, se administran dos dosis del producto ATIR101 a dosis de 2×10^6 linfocitos T/kg entre los días 28-32 y entre el 70-74 postrasplante. Este ensayo mostró unos resultados prometedores que sugerían que este método era seguro y se asociaba a una muy baja incidencia de EICH aguda. Concretamente, sólo 3 desarrollaron EICR grado 2, ningún grado 3 o 4. Más aún, de los pacientes que lo desarrollan, en 2 apareció antes de la infusión del producto, por lo que no puede atribuirse al mismo. En cuanto al riesgo de EICR crónico, solo un caso fue reportado [251].

Además de los procedimientos mencionados, en los últimos años se han desarrollado estrategias de profilaxis de EICR in vivo capaces de generar un efecto proapoptótico selectivo frente a linfocitos alorreactivos. Concretamente, Luznik et al [221] del hospital Johns Hopkins de Baltimore, describen por primera vez que el uso de ciclofosfamida postrasplante, administrada los días 3 y 4 tras la infusión de progenitores hematopoyéticos, es una estrategia muy eficaz para prevenir la EICR incluso en el contexto del trasplante haploidéntico. Este procedimiento se basa en estudios previos de Mayumi y cols. Estos investigadores describen por primera vez en modelos preclínicos que la

ciclofosfamida provocaría una apoptosis selectiva de linfocitos activados / en fase de división celular tras el trasplante hematopoyético.

Es interesante mencionar que, además de no afectar la viabilidad de los linfocitos T en reposo, la ciclofosfamida no afecta tampoco a los linfocitos T reguladores, lo que se ha atribuido a su su alta expresión de aldehído deshidrogenasa [220]. Precisamente esta alta expresión de aldehído deshidrogenasa protege a los progenitores hematopoyéticos del efecto citotóxico de la ciclofosfamida postrasplante y, por tanto, no afecta la velocidad de injerto hematopoyético ni aumenta el riesgo de fallo de injerto.

Esta estrategia se ha extendido a nivel internacional, especialmente en el contexto del trasplante haploidéntico [243, 244]. Por ejemplo, Ciurea y cols describen, en un estudio para el CIBMTR, pacientes con LMA que recibieron progenitores hematopoyéticos de donante haploidéntico con ciclofosfamida postrasplante versus progenitores de donante no emparentado histocompatible. La supervivencia global es similar en ambos grupos, e incluso el riesgo de EICR aguda grados 2-4 fue inferior entre los pacientes que se sometieron a trasplante haploidéntico (16% vs 33%) aunque la tasa de recaída fue mayor en este grupo frente a los pacientes que recibieron trasplante de donante no emparentado. .

En cuanto al uso de bortezomib como profilaxis de EICR in vivo, se ha evaluado en diversos ensayos clínicos alguno de los cuáles acaba de finalizar el

periodo de reclutamiento, por ejemplo, en combinación con tacrolimus/MTX [216, 217], con tacrolimus/rapamicina en trasplantes con acondicionamiento mieloablativo (#NCT00670423) o con ciclofosfamida postrasplante (#NCT01860170), así como con nuevos inhibidores de proteosoma como carfilzomib (#NCT01991301).

En este sentido, en el estudio de Caballero-Velázquez y cols, demostramos el efecto sinérgico de la combinación de sirolimus y bortezomib en la prevención de la EICR. Esta combinación inhibe de manera sinérgica la activación linfocitaria y la producción de citocinas proinflamatorias IFN γ , IL-2 y TNF [219]. Además, esta combinación es sinérgica también in vivo en modelo murino. Recientemente, Koreth et al (ASH 2016 #508) comunican los resultados de un estudio que compara tacrolimus y MTX versus la misma combinación más Bz versus sirolimus, tacrolimus y Bz. Si bien no encuentran diferencias entre los 3 grupos, los que reciben Bz tienen una tendencia a menor riesgo de EICR frente a los que no reciben Bz; probablemente el tamaño muestral (n=46 por rama), dificulte la obtención de diferencias significativas. En cualquier caso, y en base a los datos de nuestro estudio que muestran una clara sinergia de Bz y sirolimus, nos planteamos evaluar esta combinación en un estudio prospectivo. Por ello, diseñamos este estudio considerando únicamente pacientes con mieloma múltiple, que podrían beneficiarse de la

sinergia de estos dos fármacos tanto para prevenir la EICR como las recaídas postrasplante.

Es cierto que, aunque el trasplante alogénico representa la única opción con potencial curativo en el mieloma múltiple, el uso de nuevos fármacos, como son inhibidores de las deacetilasas de histonas, nuevos inhibidores del proteasoma, nuevos IMiDs, inhibidores de ciclinas/quinasas dependientes de ciclinas, etc., ha cambiado muy favorablemente el pronóstico de estos pacientes.

Así, carfilzomib ha sido evaluado en el ensayo clínico fase III ASPIRE (n=792) en el que se aprecia una mejoría significativa de la SLP en combinación con lenalidomida (Len) y dexametasona (Dex) en comparación con Len y Dex, alcanzando en el subgrupo de alto riesgo citogenético una SLP de hasta 23.1 meses. También el ensayo pivotal de pomalidomida (Pom) en combinación con Dex a bajas dosis demostró una mejoría con respecto a altas dosis de dexametasona en términos de SLP(de 4 meses vs 1.9 meses; hazard ratio 0.48 [95% CI 0.39-0.60]; $p<0.0001$) [258]. Además, la adición de fármacos como ixazomib, inhibidor del proteosoma oral, a esquemas que incluyen lenalidomida y dexametasona, se ha asociado a una mayor SLP (20.6 meses) con una mediana de seguimiento de 14.6 meses [262]. Finalmente, daratumumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD38, mejora la SLP cuando se administra con lenalidomida y dexametasona (LP a 12 meses e 83.2%

comparado con un 60.1% en el grupo control), con mayores tasas de RC (43.1% vs. 19.2%, $P < 0.001$).

Con toda esta información, es complicado en la actualidad posicionar el trasplante alogénico en el esquema terapéutico del MM.

En este sentido, diversos estudios prospectivos randomizados han comparado el trasplante autólogo versus alogénico en primera línea con resultados contradictorios, siendo la limitación más reseñable que en ninguno de estos estudios se emplearon nuevos fármacos. Además, en ninguno de ellos se tienen en cuenta factores de riesgo biológico como por ejemplo la citogenética adversa.

Por tanto, considerando los resultados obtenidos en pacientes de nuevo diagnóstico con nuevos fármacos y considerando también la morbilidad del trasplante, parece razonable evitar el trasplante alogénico dentro de la primera línea con la salvedad de pacientes de “ultra alto-riesgo” tal y como lo definen Moureau et al e incluso en éstos considerando su inclusión dentro de ensayos clínicos. En lo que respecta a la segunda o sucesivas líneas de tratamiento, ya se han mencionado los resultados de los estudios pivotaes más importantes empleando nuevos fármacos. Únicamente Patriarca et al comparan el trasplante alogénico frente a nuevos fármacos en pacientes en recaída.

En cuanto a los regímenes de acondicionamiento, el uso de intensidad reducida se ha generalizado en base a su menor mortalidad relacionada con el

trasplante. Sin embargo, a pesar de que hay trabajos que refieren mejor SG y SLP (39 y 16% a 10 años), no parecen disminuir ni el índice de recaídas ni la incidencia de EICR [275]. En este sentido, es especialmente importante el estado de la enfermedad al trasplante [276, 277] y, por esta razón, en pacientes de alto riesgo se debe insistir en la aplicación de cualquier tratamiento de rescate que mejore la enfermedad al trasplante.

Es por esto que son necesarias estrategias dirigidas a optimizar el procedimiento del trasplante alogénico, mejorando el efecto antitumoral del acondicionamiento de intensidad reducida así como implementando nuevas estrategias que disminuyan el riesgo de EICR sin aumentar el riesgo de recaída. En este sentido, en un estudio previo en el contexto del grupo español de mieloma, nuestro grupo (Caballero-Velázquez et al) describió por primera vez una experiencia preliminar en la que incluimos el bortezomib dentro del acondicionamiento pretrasplante basado en fludarabina y melfalán. Por ello, planteamos el ensayo clínico base del presente trabajo de tesis doctoral en el que incorporamos el Bz antes y justo después de la administración de fludarabina y melfalán como parte del acondicionamiento. A esta combinación, y siempre hablando en términos de eficacia antitumoral, se le añade la combinación Bz más sirolimus que, como se ha mencionado anteriormente, no sólo tiene un efecto sinérgico para prevenir la EICR sino que además ejerce un potente efecto antimieloma. Todos los pacientes que incluimos en este ensayo

fase I, habían sido diagnosticados de mieloma múltiple y 2 de leucemia de células plasmáticas. Únicamente 7 se trasplantaron en RC, uno de ellos precisamente correspondía a una leucemia de células plasmáticas y los 6 restantes habían necesitado entre 2 y 5 líneas de tratamiento para alcanzar la primera remisión, habiendo pacientes con hasta 8 líneas previas de tratamiento, un 72% con TASPE previo y la mitad con enfermedad extramedular al diagnóstico. Pues bien, a pesar de las características tan desfavorables de esta serie, comprobamos que a día +100, 14 pacientes estaban en RC (67%), 1 en muy buena respuesta parcial (4%) y 4 (19%) en RP, confirmando por tanto la eficacia de la aproximación en términos de respuesta de la enfermedad. La mediana de SLP entre los pacientes que alcanzaron RC tras trasplante fue de 15 meses (11.5-18) y la SLR entre los que alcanzaron al menos RP de 12.5 meses (2-23). Además, con una mediana de seguimiento de 21.3 meses, la SG a 2 años era del 60% y la SLE del 24%, datos muy relevantes teniendo en cuenta las características de los pacientes incluidos. Es más, a fecha de último seguimiento, el 56% de los pacientes continúan vivos. En lo que respecta al control de la enfermedad a largo plazo, cabe extraer dos mensajes: 1- el trasplante alogénico no permite mantener la remisión a largo plazo en pacientes en fases tan avanzadas y 2- probablemente, al igual que fuera del trasplante, será importante incorporar estrategias de mantenimiento que incluyan nuevas drogas para favorecer el efecto injerto contra mieloma. En este sentido, el

ensayo fase II puesto en marcha, pretende evaluar precisamente estos dos conceptos. Cabe señalar el potencial riesgo de EICR en pacientes que reciben Len postrasplante alogénico. En este sentido, diversos estudios han descrito la eficacia de la Len como tratamiento del mieloma en pacientes que recaen postrasplante pero en muchos de ellos se pone de manifiesto que su administración se asocia con un mayor riesgo de EICR.

En términos de EICR, los 5 pacientes que recibieron Bz y sirolimus desarrollaron EICR. Si bien es cierto que en todos los casos fueron grados 1 y 2 y que respondieron rápidamente al tratamiento con esteroides, siguiendo los criterios de parada el ensayo se detuvo y se planteó una enmienda, de manera que los restantes pacientes recibieron la triple combinación sirolimus/Bz/tacrolimus. Con ella, solo 3 de 20 pacientes analizables presentaron EICR aguda grado 3 para una incidencia acumulada de grados 2-4 del 35% y una incidencia acumulada de EICH crónica del 17%,. Por otro lado, no se reportaron SAEs relacionados con la medicación, lo que refleja la seguridad de este esquema, dato especialmente relevante teniendo en cuenta la comorbilidad que presentan estos pacientes.

El ensayo se acompañó de un estudio biológico minucioso a lo largo del postrasplante en el que se analizaron por citometría de flujo las distintas poblaciones celulares en el curso evolutivo y se compararon con un grupo control de sujetos sanos. Destacó la ausencia de reconstitución de la

subpoblación de DCs plasmocitoides, siendo el porcentaje de éstas significativamente inferior en los pacientes en comparación con una cohorte de sujetos sanos. Este hallazgo ya ha sido descrito previamente, de manera que la reconstitución completa de esta subpoblación puede retrasarse más allá de un año postrasplante [289, 290]. Niveles bajos de DCs se han identificado en individuos alérgicos, con enfermedades autoinmunes o enfermedades malignas [291-293].

Por otro lado se comprueba la falta de recuperación de la población B que persiste hasta el año postrasplante así como unos niveles disminuidos de CD40L en las células T en los pacientes sometidos a trasplante con respecto a los sujetos sanos. Ambos hallazgos podrían reflejar una dificultad en la interacción de los linfocitos T y B a través de CD40L en el centro germinal afectando a la activación B dependiente de linfocitos T en los pacientes sometidos a trasplante y con tratamiento inmunosupresor.

Sin embargo, en comparación con sujetos sanos, los pacientes presentan unos niveles de IFN significativamente aumentados en el día +180 y +270 postrasplante, fundamental tras activación linfocitaria in vitro. En relación con la distribución de los linfocitos T naive/memoria/efectores, se observa una menor proporción de linfocitos T naive y memoria tanto en CD4 como CD8 a favor de un mayor porcentaje de linfocitos T memoria periférica posiblemente

en relación con la falta de recuperación del timo (pacientes de edad avanzada) y una menor diversidad del repertorio de linfocitos.

Al igual que han descrito otros autores [294], los niveles de las células NK bright (CD56++) permanecen aumentados hasta 12 meses después del trasplante.

.

CONCLUSIONES

EN RELACIÓN CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB EMPLEADO IN VITRO EN LA PROFILAXIS DE EICH (ALODEPLETE)

1. La activación óptima de linfocitos T aloreactivos en el cultivo mixto se produce con una proporción 3:1 de linfocitos respondedores : células estimuladoras.
2. La depleción de linfocitos T dentro de las células estimuladoras aumenta la capacidad de estimular la activación linfocitaria en la fracción respondedora.
3. La concentración de bortezomib óptima para generar la máxima alodeplección posible manteniendo la viabilidad de los linfocitos no aloreactivos está entre 10 y 12 nM.
4. α -MEM ha mostrado ser un medio óptimo para mantener la viabilidad de los linfocitos no alorreactivos durante el procedimiento de alodepleción.
5. La congelación no afecta a la viabilidad celular del producto alodeplecionado.
6. A escala clínica, el proceso de alodepleción se optimiza con una proporción 5:1 de células respondedoras : estimuladoras manteniendo el cultivo en agitación 48 horas tras su inicio.

7. La adición de ciclofosfamida a bortezomib in vitro no ofreció efecto sinérgico.

EN RELACIÓN CON EL EFECTO DE BORTEZOMIB EMPLEADO IN VIVO EN LA PROFILAXIS DE EICH (*ENSAYO CLINICO EMN*)

1. La adición de bortezomib al acondicionamiento con fludarabina y melfalán es segura y eficaz en términos de respuesta del mieloma tras el trasplante alogénico.

2. La combinación de bortezomib/rapamicina/tacrolimus ha mostrado un perfil adecuado de seguridad y eficacia como profilaxis de EICR.

3. Nuestros datos biológicos sobre reconstitución inmune tras trasplante nos permitieron encontrar diferencias significativas en relación con un grupo de sujetos sanos en el porcentaje de CDs plasmocitoides y de linfocitos B, inversión del ratio CD4/CD8, alteración en el repertorio de células NK bright y weak así como alteración en la distribución de naive/memoria/efector.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] Nossal GJ. Current concepts: immunology. The basic components of the immune system. *N Engl J Med*. 1987 May 21;316(21):1320-5.
- [2] Medzhitov, R., Janeway, C.A., Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 10, 351-353.
- [3] Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. *Inmunología celular y molecular*. Séptima edición.
- [4] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):819-26. Review.
- [5] Friedl P., Gunzer M. Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model *TRENDS in Immunology* 2001; 22: 187-191.
- [6] Fresnay S, Garnache-Ottou F, Plumas J, Seilles E, Tiberghien P, Saas P. Can tolerogenic dendritic cells help to modulate allo-immune responses in the setting of hematopoietic cell transplantation?. *Transplant Immunology* 2003; 11: 259-66.
- [7] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 685-711.
- [8] Felix NJ, Allen PM. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol*. 2007 Dec;7(12):942-53.
- [9] Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and

Allograft Rejection. *Front Immunol.* 2016 Dec 14;7:582.

[10] Goulmy EAJM, LUMC. Minor Histocompatibility antigens: from T cell recognition to peptide identification [Internet]. *Human Immunol.*, 54, 8 - 14, (1997)1997.

[11] Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg F, Vossen J, et al. Mismatches of Minor Histocompatibility Antigens between HLA-Identical Donors and Recipients and the Development of Graft-Versus-Host Disease after Bone Marrow Transplantation. *New England Journal of Medicine* 1996;334(5):281-5. ^[L]_[SEP]

[12] Den Haan J, Sherman N, Blokland E, Huczko E, Koning F, Drijfhout J, et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995;268(5216):1476-80.

[13] Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385–389.

[14] Fernando Macian. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology.* 2005: 5, 472-484.

[15] Masuda E, Imamura R, Amasaki Y, Arai K, Arai N. Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal.*1998;10:599-611.

[16] Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell.* 2002;109:719-731.

-
- [17] Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T, et al. In vivo anergized CD4₊ T cells express perturbed AP-1 and NF- κ B transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:979-984.
- [18] Hayden, M.S., Ghosh, S. (2011). NF- κ B in immunobiology. *Cell Res*. 21, 223-44
- [19] Jeong, E., Lee, J.Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J*. 52, 379-392.
- [20] Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 351-8.
- [21] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- [22] Reis e Sousa C: Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:476.
- [23] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 621-7
- [24] Erlich HA, Opelz G, Hansen J: HLA DNA typing and transplantation. *Immunity*. 2001;14:347.
- [25] Shlomchik WD: Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:340.

-
- [26] Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik D and Shlomchik MJ. Distinct roles for donor and host derived antigen presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft- versus -host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005; 105: 2227-34.
- [27] Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285:412.
- [28] Sakaguchi, S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M. Immunologic Tolerance maintained by activated T cells expressing IL2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. 155: 1151-1164.
- [29] Baecher-Allan, C., Viglietta V and Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 2004. 16: 89-98.
- [30] Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 2005. 6, 345-352.
- [31] Jiang S, Lechler RI, He XS, Huang JF. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006;67:765-76.
- [32] Nelson BH, McIntosh BC, Rosencrans LL, Greenberg PD. Requirement for an initial signal from the membrane-proximal region of the interleukin 2 receptor gamma(c) chain for Janus Kinase activation leading to T cell

proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1878-83.

[33] Besinger S, Walsh PT, Zhang J, Carroll M, Parsons R, Rathmell JC, Thompson CB, Burchill MA, Farrar MA, Turka LA. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172:5287-96.

[34] Zeiser R, Leveson Gower DB, Zambricki EA, Kambham N, Beihack A, Loh J, Hou JZ, Negrin RS. Differential impact of mTOR inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells as compared to conventional CD4+ T cells. *Blood* 2008; 111: 453-462.

[35] Crellin NK, Garcia NV, Levings MK. Altered activation of Akt is required for the suppressive function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood* 2006; 109:2014-22.

[36] Walsh P, Buckler JL, Zhang J, Gelman AE, Dalton NM, Taylor DK, Besinger SJ, Hancock WW, Turka LA. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4 CD25 Tregs. *J Clin Invest* 2006; 116:2521-31

[37] Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005; 105:4743-8.

[38] Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006; 117:8338-47.

-
- [39] Valmori D, Tosello V, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Wang Y, Ayyoub M. Rapamycin-Mediated Enrichment of T Cells with Regulatory Activity in Stimulated CD4 T Cell Cultures Is Not Due to the Selective Expansion of Naturally Occurring Regulatory T Cells but to the Induction of Regulatory Functions in Conventional CD4 T Cells. *J Immunol* 2006; 177:944-9.
- [40] Uss E, Yong SL, Hooibrink B, van Lier RA, Ten Berge IJ. Rapamycin enhances the number of alloantigen-induced human CD103+CD8+ regulatory T cells in vitro. *Transplantation*. 2007;83:1098-106.
- [41] Frank D, Robertson MJ, Bonni A, Ritz J, Greenberg ME Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7779-83.
- [42] Murawski MR, Litherland SA, Clare Salzler MJ, Davoodi Semiromi A. Upregulation of Foxp3 expresion in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1079:198-204.
- [43] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61
- [44] Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 2003;4, 337–342.
- [45] Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the

development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003;4, 330–336.

[46] Brunkow, ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68-73.

[47] Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev.* 2005;203:156-64.

[48] Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.

[49] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-42.

[50] McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-23.

[51] Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, and Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T-cell subset. I Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance: deficit

of a T-cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1985. 161, 72-87.

[52] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003; 9:1144.

[53] Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, Ho L, Kambham N, Bachmann M, Brown JM, Negrin RS. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 2007; 109:264

[54] Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versushostdisease lethality. *Blood* 2002;99:3493-9.

[55] Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006; 107:1717-23.

[56] Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3+CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versushost disease. *Blood* 2005;106:2903-11.

[57] Colf LA, Bankovich AJ, Hanick NA. How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC. *Cell.* 2007 Apr 6;129(1):135-46.

-
- [58] Vivier E, Malissen B. Innate and adaptative immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *In* *Nat Immunol*. 2005 Jan;6(1):17-21.
- [59] Archbold JK, Macdonald WA, Burrows SR. T-cell allorecognition: a case of mistaken identity or déjà vu? *Trends Immunol*. 2008 May;29(5):220-6.
- [60] Reiser, J-B. et al. (2002) A T cell receptor CDR3b loop undergoes conformational changes of unprecedented magnitude upon binding to a peptide/MHC class I complex. *Immunity* 16, 345–354.
- [61] Doxiadis, II et al. (1996) Association between specific HLA combinations and probability of kidney allograft loss: the taboo concept. *Lancet* 348, 850–853.
- [62] Maruya, E. et al. (1993) HLA matching: identification of permissible HLA mismatches. *Clin. Transpl*. 511–520.
- [63] Mifsud, N.A. et al. (2008) Immunodominance hierarchies and gender bias in direct TCD8 cell alloreactivity. *Am. J. Transplant*. 8, 121–132.
- [64] Luz, J.G. et al. (2002) Structural comparison of allogeneic and syngeneic T cell receptor-peptide-major histocompatibility complex complexes: a buried alloreactive mutation subtly alters peptide presentation substantially increasing V(beta) Interactions. *J. Exp. Med*. 195, 1175–1186.
- [65] Archbold, J.K. et al. (2006) Alloreactivity between disparate cognate and allogeneic pMHC-I complexes is the result of highly focused, peptide-dependent structural mimicry. *J. Biol. Chem*. 281, 34324– 34332.

-
- [66] Lopez, D. et al. (1992) Peptide-presenting similarities among functionally distant HLA-B27 subtypes revealed by alloreactive T lymphocytes of unusual specificity. *J. Immunol.* 148, 996–1002.
- [67] Macdonald, W.A. et al. (2003) A naturally selected dimorphism within the HLA-B44 supertype alters class I structure, peptide repertoire, and T cell recognition. *J. Exp. Med.* 198, 679–691.
- [68] Kolb HJ, Schmidt C, Barrett AJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood.* 2004;103(3):767–776.
- [69] James L.M. Ferrara, John E. Levine, Pavan Reddy and Ernst Holler. Graft-versus-Host Disease. *Lancet.* 2009 May 2; 373(9674): 1550–1561.
- [70] EBMT. Annual Report 2016.
- [71] Gyurkocza, Andrew Rezvani and Rainer F Storb. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol.* 2010 June ; 3(3): 285–299.
- [72] Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966-1967;62:21-78.
- [73] Korngold R, Sprent J. Purified T cell subsets and lethal graft-versus-host disease in mice. In: Gale RP; Champlin R, editors. *Progress in bone marrow Transplantation.* Alan R. Liss, Inc; New York: 1987.p 213-218.
- [74] Kernan NA, Collins NH, Juliano LL, Cartagena TT, Dupont BB, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants

correlate with development of graft-versus-host disease. *Blood* 1986; 68:770-773.

[75] Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-vs-host disease. En Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation 3rd ed. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR Editores. Blackwell Publishing USA, pp 353, 2004

[76] Shernan G, Holtan, Marcelo Pasquini and Daniel J. Weisdorf. Acute graft-versus-host disease: a bench-to-bedside update. *Blood*. 2014 Jul 17; 124(3): 363–373.

[77] Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285:412.

[78] Matzinger P: The danger model: A renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301.

[79] Hofmeister CC, Quinn A, Cooke KR et al. Graft versus host disease of the skin: life and death on the epithelial edge. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004 10: 366.

[80] Hill GR, Ferrara JL. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft versus host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000 95: 275 4.

[81] Korngold R, Sprent J. Negative selection of T cells causing lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers. Role of the H-2 complex. *J Exp Med*. 1980; 151(5):1114–1124.

-
- [82] Beilhack A, Schulz S, Baker J, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*. 2005; 106(3):1113–1122.
- [83] Theobald M, Nierle T, Bunjes D, Arnold R, Heimpel H. Host specific interleukin-2 secreting donor T cell precursors as predictors of acute graft versus host disease in bone marrow transplantation between HLA identical siblings. *N Eng J Med*. 1992;327:1613-7.
- [84] Blazar BR, Taylor PA, Smith S, et al. Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow grafts. *Blood* 1995;85:842–51.
- [85] Banovic T, MacDonald KP, Morris ES, et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 2005;106:2206 –14.
- [86] Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglan SJ, et al. Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* 2001;98:2256–65.
- [87] Alpdogan O, Muriglan SJ, Eng JM, et al. IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 2003;112:1095–107.
- [88] Sinha ML, Fry TJ, Fowler DH, et al. Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 2002;100: 2642–9.

-
- [89] Gendelman M, Hecht T, Logan B, et al. Host conditioning is a primary determinant in modulating the effect of IL-7 on murine graft-versus-host disease. *J Immunol* 2004;172:3328–36.
- [90] Weaver CT, Murphy KM. T-cell subsets: the more the merrier. *Curr Biol* 2007;17:R61–3.
- [91] Falkenbur JH, Corput L, Marijt WA, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2003;31:743.
- [92] Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, Hochberg EP, Wu CJ, Alyea EP, Cutler C, Ho V, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*. 2005;105:2973-8.
- [93] Hart B, Kooyk Y. Yin-Yang regulation of autoimmunity by DCs. *Trneds inImmunol* 25: 353, 2004
- [94] Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003;102: 2187-94.
- [95] Weiss A, Littman D. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994; 76: 263-74.
- [96] Werlen G, Palmer E. The TCR signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr Op Immunol*. 2002;14:299-305.

-
- [97] Bernard A, Lamy L, Alberti I. The two signal model of T-cell activation after 30 years. *Transplantation*. 2002;73: S31-5.
- [98] Sung W. Choi, John E. Levine and James L.M. Ferrara. Pathogenesis and Management of Graft versus Host Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2010 February ; 30(1): 75–101.
- [99] van den Brink MR, Burakoff SJ. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 273–81.
- [100] Maeda Y, Levy RB, Reddy P, et al. Both perforin and Fas ligand are required for the regulation of alloreactive CD8₊ T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:2023–7.
- [101] Dignan FL, Amrolia P, Clark A, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, et al. Diagnosis and management of chronic graft-versus-host disease. *British Journal of Haematology*, 2012. 158(1):46-61.
- [102] Atkinson K, Incefy GS, Storb R et al. Low serum thymic hormone levels in patients with chronic graft versus host disease. *Blood* 1982; 59: 1073-7
- [103] Shimabukuro-Vornhagen A, Hallek MJ, Storb RF, von Bergwelt-Baildon MS. The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009; 114:4919–4927
- [104] Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*.

2011; 117:3214–3219.

[105] Ritchie D, Seconi J, Wood C et al. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005; 11: 706–712.

[106] Dickinson AM & Charron D. Non-HLA immunogenetics in hematopoietic stem cell transplantation. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17: 517–525.

[107] Perez Simon JA, Afram GN, Martino R, Pinana JL, Caballero-Velazquez T, Ringden O, Valcarcel D, Caballero D, Remberger M, de Paz Y, Sierra J, San Miguel JF, Hagglund H. Evaluation of prognostic factors among patients with chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 2012 Aug;97(8):1187-95

[108] Allogeneic Peripheral Blood Stem-Cell Compared With Bone Marrow Transplantation in the Management of Hematologic Malignancies: An Individual Patient Data Meta-Analysis of Nine Randomized Trials. *Stem Cell Trialists' Collaborative Group. J Clin Oncol* 2005; 23:5074-5087

[109] Lee SJ. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105: 4200–4206.

[110] Lin MT, Storer B, Martin PJ et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2201–2210.

-
- [111] Banovic T, MacDonald KP, Morris ES et al. TGF-beta in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe? *Blood* 2005; 106: 2206–2214.
- [112] Blazar BR & Taylor PA. Regulatory T cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005; 11: 46–49.
- [113] Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004; 104: 2187–2193.
- [114] Zorn E, Kim HT, Lee SJ et al. Reduced frequency of FOXP3 β CD4 β CD25 β regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 106: 2903–2911.
- [115] Rieger K, Loddenkemper C, Maul J et al. Mucosal FOXP3 β regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006; 107: 1717–1723.
- [116] Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Swedin JM, et al. L-Selectin(hi) but not the L-selectin(lo) CD4 β 25 β T-regulatory cells are potent inhibitors of GVHD and BM graft rejection. *Blood* 2004; 104:3804–3812.
- [117] Dutt S, Tseng D, Ermann J et al. Naive and memory T cells induce different types of graft-versus-host disease. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 2007; 179: 6547–6554.
- [118] Nikolic B, Khan A & Sykes M. Induction of tolerance by mixed chimerism with nonmyeloblastic host conditioning: the importance of overcoming intrathymic alloresistance. *Biology of Blood and Marrow*

Transplantation 2001; 7: 144–153.

[119] Cutler C & Antin JH. Chronic graft-versus-host disease. *Current Opinion in Oncology* 2006; 18: 126–131.

[120] Miklos DB, Kim HT, Miller KH et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005; 105: 2973–2978.

[121] Ritchie D, Seconi J, Wood C et al. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2005; 11: 706–712.

[122] She K, Gilman AL, Aslanian S et al. Altered toll-like receptor 9 responses in circulating B cells at the onset of extensive chronic graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2007;13: 386–397.

[123] Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. High Levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 6107–6114.

[124] Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2014 Jul 17;124(3):374-84.

[125] Allen JL1, Fore MS, Wooten J. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways.*Blood*. 2012 Sep 20;120(12):2529-36.

-
- [126] Allen JL, Tata PV, Fore MS. Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood*. 2014 Mar 27;123(13):2108-15.
- [127] Dubovsky JA, Flynn R, Du J. Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. *J Clin Invest*. 2014 Nov;124(11):4867-76.
- [128] Martin PJ, Schoch G, Fisher L, et al. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 1990;76:1464–1472.
- [129] Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hemat* 1991;28:250–259.
- [130] Sullivan KM, Mori M, Sanders J, et al. Late complications of allogeneic and autologous marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10:127–134
- [131] Kim DH, Sohn SK, Kim JG, et al. Clinical impact of hyperacute graft-versus-host disease on results of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(10):1025-30.
- [132] Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-956.
- [133] Esteban JM, Somlo G. Skin biopsy in allogeneic and autologous bone marrow transplantation patients: a histologic and immunohistochemical study

and review of the literature. *Mod Pathol* 1995; 8: 59.

[134] Weisdorf DJ, Snover DC, Haake R, et al. Acute upper gastrointestinal graft-vs-host disease: clinical significance and response to immunosuppressive therapy. *Blood* 1990; 76: 624-629.

[135] Sale GE, Alavaikko M, Schaefer KM, et al. Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-vs-host disease (GVHD): an immunohistological study. *Exp Hematol* 1992; 20:1017

[136] Jabs DA, Wingard J, Green RW et al .The eye in bone marrow transplantation . *Arch Ophthalmol* 1989;107:1343-1348.

[137] Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*. 1997 Jun;97(4):855-64.

[138] Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 15: 825.

[139] Gratwohl, A., Brand, R., Apperley, J et al. Graft versus host disease and outcome in HLA-identical sibling transplant for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100: 3877–3886

[140] Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, et al. Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Societe Francaise de Greffe de Moelle et Therapie Cellulaire (SFGMTC), Dana Farber Cancer Institute

(DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. *Blood*. 2005;106:1495-1500.

[141] Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarca I, Díez-Campelo M, Caballero D, San Miguel J. Chronic graft-versus-host disease : pathogenesis and clinical management. *Drugs*. 2006; 66(8):1041-57

[142] Anasetti C, Logan B, Lee S, Waller E, Weisdorf D, Wingard J, Cutler J et al. Peripheral-Blood Stem Cells versus Bone Marrow from Unrelated Donors. *N Engl J Med* 2012;367:1487-96.

[143] Pidala J, Kurland B, Chai X, et al. Patient reported quality of life is associated with severity of chronic graft-versus-host disease as measured by NIH criteria: report on baseline data from the Chronic GVHD Consortium. *Blood*. 2011; 117(17): 4651-4657

[144] Stewart BL, Storer B, Storek J. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease *Blood*. 2004; 104(12):3501-

[145] Pérez-Simon JA, Encinas C, Silva F, Arcos MJ, Díez-Campelo M, Sánchez-Guijo F, Colado E, Martín J, Vazquez L, Cañizo C, Caballero D, San Miguel JF. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: the national institutes health scale plus the type of onset can predict survival rates and the duration of immunosuppressive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Oct;14(10):1163-71

- [146] Pérez-Simón JA, Martino R, Caballero D, Valcarcel D, Rebollo N, Cámara R, Pérez de Oteiza J, Heras I, Calvo MV, Sierra J, San Miguel JF. Reduced intensity conditioning allogeneic transplantation from unrelated donors: evaluation of Mycophenolate Mofetil plus Cyclosporin A as graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood and Marrow Transplant* 2008; 14(6):664-71
- [147] Carlens S, Ringden O, Remberger M, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:755–761.
- [148] Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL et al. Chronic graft versus host disease syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. 1980; 69: 204-17.
- [149] Teshima T, Ferrara JL. Pathogenesis and prevention of acute graft-versus-host-disease. *Current opinion in organ transplantation*. 2001;6:265-71. [SEP]
- [150] Horowitz M. Does matched unrelated donor transplantation have the same outcome as matched sibling transplantation in unselected patients? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2012;25:483-6.
- [151] Furst D, et al. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood*. 2013;122(18):3220-9.
- [152] Bleakley MR, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-

leukaemia effect. *Nature Rev Cancer* 2004;4:371–380.

[153] Sophie Servais, Yves Beguin, Loic Delens Novel approaches for preventing acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opinion on Investigational Drugs* Volume 25, 2016 - Issue 8.

[154] Storb R, Antin JH, Cutler C. Should methotrexate plus calcineurin inhibitors be considered standard of care for prophylaxis of acute graft-versus-host disease? *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(1 Suppl):S18–S27.

[155] Ruutu T, Gratwohl A, de WT, et al. Prophylaxis and treatment of GVHD: EBMT-ELN working group recommendations for a standardized practice. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(2):168–173.

[156] Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis for leukemia. *N. Engl. J. Med*. 1986;314:729-735.

[157] Nash RA, JH. Antin, C. Karanes, JW. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 200;96:2062-8.

[158] Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and

cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92:2303-14.

[159] Vezina, C.; A. Kudelski and SN. Sehgal: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiotics*. 1975;28: 721 -726.

[160] Sehgal SN., H. Baker, C. Vezima: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiotics*. 1975; 28: 727-732.

[161] Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastre B. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105:2527-34.

[162] Vaysberg M, Balatoni CE, Nepomuceno RB, Krams SM, Martinez OM. Rapamycin inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas through modulation of cell-cycle protein expression. *Transplantation*. 2007; 83:1114-21.

[163] Calne, R. Y., D. S. Collier, S. Lin, S. G. Pollard, A. Saman, D. J. White, and S. Thiru.. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 1989;227

[164] Terada N, Takase K, Papst P, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin inhibits ribosomal protein synthesis and induces G1 prolongation in mitogenactivated T lymphocytes. *J Immunol*. 1995;155: 3418-3426.

-
- [165] Blume-Jensen P, Hunter T: Oncogenic Kinase signaling. *Nature* 2001;411:355.
- [166] Schmelzle T, Hall MN: TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:25.
- [167] Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N: Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Gen Dev* 2001; 15:807.
- [168] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23:3151-3171.
- [169] Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124:471-484.
- [170] Hay, N. and Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Dev.* 18: 1926–1945.
- [171] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296:1655-1657.
- [172] Leslie NR, Downes CP. PTEN: the down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal*. 2002;14:285-295.
- [173] Manning, B.D. and Cantley, L.C. 2007. Akt/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* 129: 1261–1274.
- [174] Han C. Dan, Matthew J. Cooper, Patricia C. Cogswell, Joseph A. Duncan, Jenny P.-Y. Ting and Albert S. Baldwin. Akt-dependent regulation of NF- κ B is

controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes & Dev.* 2008 22: 1490-1500.

[175] Sawyers, C.L. 2003. Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs? *Cancer Cell* 4: 343–348.

[176] Terada N, Takase K, Papst P, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin inhibits ribosomal protein synthesis and induces G1 prolongation in mitogenactivated T lymphocytes. *J Immunol.* 1995;155: 3418-3426.

[177] Zeiser R, Leveson Gower DB, Zambricki EA, Kambham N, Beihack A, Loh J, Hou JZ, Negrin RS. Differential impact of mTOR inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells as compared to conventional CD4+ T cells. *Blood* 2008; 111: 453-462.

[178] Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005; 105:4743-8.

[179] Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006; 117:8338-47.

[180] Valmori D, Tosello V, Souleimanian NE. Rapamycin-Mediated Enrichment of T Cells with Regulatory Activity in Stimulated CD4 T Cell Cultures Is Not Due to the Selective Expansion of Naturally Occurring Regulatory T Cells but to the Induction of Regulatory Functions in Conventional CD4 T Cells. *J Immunol* 2006; 177:944-9.

-
- [181] Uss E, Yong SL, Hooibrink B, van Lier RA, Ten Berge IJ. Rapamycin enhances the number of alloantigen-induced human CD103+CD8+ regulatory T cells in vitro. *Transplantation*. 2007;83:1098-106.
- [182] Cutler C, Li S, Ho VT, Koreth J, Alyea E, Soiffer RJ, Antin JH. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2007 Apr 1;109:3108-14.
- [183] Parody R, López-Corral L, Lopez-Godino O. GvHD prophylaxis with tacrolimus plus sirolimus after reduced intensity conditioning allogeneic transplantation: results of a multicenter study. *Bone Marrow Transplant*. 2016 Nov;51(11):1524-1526.
- [184] Philippe Armand, Haesook T. Kim, Marie-Michele Sainvil. The Addition of Sirolimus to the Graft-Versus-Host Disease Prophylaxis Regimen in Reduced Intensity Allogeneic Stem Cell Transplantation for Lymphoma: A Multicentre Randomized Trial. *Br J Haematol*. 2016 April ; 173(1): 96–104.
- [185] Yu C, Seidel K, Nash RA, et al. Synergism between mycophenolate mofetil and cyclosporine in preventing graft-versus-host disease among lethally irradiated dogs given DLA-nonidentical unrelated marrow grafts. *Blood*. 1998;91(7):2581–2587
- [186] Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, et al. Unrelated donor granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell

transplantation after nonmyeloablative conditioning: the effect of postgrafting mycophenolate mofetil dosing. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:454–465.

[187] Baron F, Sandmaier BM, Storer BE, et al. Extended mycophenolate mofetil and shortened cyclosporine failed to reduce graft-versus-host disease after unrelated hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(9):1041–1048.

[188] Lazaryan A, Weisdorf DJ, DeFor T, et al. Risk factors for acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation with umbilical cord blood and matched sibling donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(1):134–140.

[189] Stem Cell Trialists' Collaborative G. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol.* 2005;23(22):5074–5087.

[190] Savani BN, Labopin M, Blaise D, et al. Peripheral blood stem cell graft compared to bone marrow after reduced intensity conditioning regimens for acute leukemia – a report from the ALWP of the EBMT. *Haematologica.* 2016;101(2):256–262.

[191] Socié G, Schmoor C, Bethge WA, Chronic graft-versus-host disease: long-term results from a randomized trial on graft- versus-host disease

prophylaxis with or without anti-T-cell globulin ATG-Fresenius. *Blood*. 2011 Jun 9;117(23):6375-82.

[192] Soiffer RJ, Lerademacher J, Ho V. Impact of immune modulation with anti-T-cell antibodies on the outcome of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *Blood*. 2011 Jun 23;117(25):6963-70.

[193] Hannon M, Beguin Y, Ehx G, et al. Immune recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following flu-TBI versus TLI-ATG conditioning. *Clin Cancer Res*. 2015;21(14):3131–3139.

[194] Servais S, Menten-Dedoyart C, Beguin Y, et al. Impact of pre-transplant anti-T cell globulin (ATG) on immune recovery after myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *PloS one*. 2015;10(6):e0130026.

[195] Kroger N, Solano C, Wolschke C, et al. Antilymphocyte globulin for prevention of chronic graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 2016;374(1):43–53.

[196] Walker I, Panzarella T, Couban S, et al. Pretreatment with anti-thymocyte globulin versus no anti-thymocyte globulin in patients with haematological malignancies undergoing haemopoietic cell transplantation from unrelated donors: a randomised, controlled, open-label, phase 3, multicentre trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(2):164–173.

[197] Baron F, Labopin M, Blaise D, et al. Impact of in vivo T-cell depletion on

outcome of AML patients in first CR given peripheral blood stem cells and reduced-intensity conditioning allo-SCT from a HLA-identical sibling donor: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(3):389–396.

[198] Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2000;96(7):2419–2425.

[199] Chakraverty R, Orti G, Roughton M, et al. Impact of in vivo alemtuzumab dose before reduced intensity conditioning and HLA-identical sibling stem cell transplantation: pharmacokinetics, GVHD, and immune reconstitution. *Blood*. 2010;116(16):3080–3088.

[200] Hideshima T, P. Richardson, D. Chauhan, V. Palombella, E. Elliot, J. Adams, K. Anderson. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*. 2001;61:3071-76.

[201] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*. 1999; 59:2615.

[202] Adams J: Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*. 2002;7:9.

- [203] Naujokat C, Hoffmann S: Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest.* 2002; 82:965.
- [204] Palombella V, Rando O, Goldberg A, Maniatis T. The ubiquitin proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell.* 1994;78:773-785.
- [205] Li B, Q. Dou. Bax degradation by the ubiquitin / proteasome dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2000;97:3835-55.
- [206] Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221-7.
- [207] Tas SW, de Jong EC, Hajji N, May MJ, Ghosh S, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Selective inhibition of Nf- κ B in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur J Immunol.* 2005; 35: 1164-74.
- [208] Matsumoto M, Yamada T, Yoshinaga SK, Boone T, Horan T, Fujita S, Li Y, Mitani T. Essential role of NF- κ B inducing kinase in T cell activation through the CDR/CD3 pathway. *J Immunol* 2002; 169: 1151-8.
- [209] O'Keeffe M, Grumont RJ, Hochrein H, Fuchsberger M, Gugasyan R, Vremec D, Shortman K, Gerondakis S. Distinct roles for the NF- κ B1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 2005; 106:

3457-64.

[210] Akira S, Takeda K. Toll like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.

[211] Chabner Bruce A, Lynch Thomas, et al. *Harrison Manual de Oncología*. 1ª ed. Mc Graw Hill, 2009.

[212] Belén Blanco, José A. Pérez-Simón, Luis I. Sánchez-Abarca, et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood*. 2006; 107:3575-83.

[213] Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Inhibition of acute graft versus host disease with retention of graft versus tumor effects by the proteasome inhibitor Bortezomib. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101: 8120-5.

[214] Sun K, Wilkins DE, Anver MR, et al. Differential effects of proteasome inhibition by bortezomib on murine acute graft versus host disease: delayed administration of bortezomib results in increased GVHD-dependent gastrointestinal toxicity. *Blood*. 2005; 106: 3293-9.

[215] Mohty M, Brissot E, Savani BN, et al. Effects of bortezomib on the immune system: a focus on immune regulation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(10):1416–1420.

[216] Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, Garcia M, Ho VT, Armand P, Cutler C, Ritz J, Antin JH, Soiffer RJ, Alyea EP 3rd. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity

conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood*. 2009;114:3956-9.

[217] Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, et al. Bortezomib-based graft-versus-host disease prophylaxis in HLA-mismatched unrelated donor transplantation. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3202–3208.

[218] Blanco B, Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarca LI et al. Treatment with bortezomib of human CD4+ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population. *Haematologica* 2009; 94(7): 975

[219] Caballero-Velázquez T, Sánchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosío S. The novel combination of sirolimus and bortezomib prevents graft-versus-host disease but maintains the graft-versus-leukemia effect after allogeneic transplantation. *Haematologica*. 2012 Sep;97(9):1329-37.

[220] Kanakry CG, Ganguly S, Zahurak M, et al. Aldehyde dehydrogenase expression drives human regulatory T cell resistance to posttransplantation cyclophosphamide. *Sci Transl Med*. 2013;5(211):211–157.

[221] Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, post-transplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):641–650.

[222] Luznik L, Jones RJ, Fuchs EJ. High-dose cyclophosphamide for graft-

versus-host disease prevention. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(6):493-499.

[223] Kwon M, Bautista G, Balsalobre P. Haplo-Cord transplantation compared to haploidentical transplantation with post-transplant cyclophosphamide in patients with AML. *Bone Marrow Transplant*. 2017 Mar 27.

[224] Zeidan AM, Forde PM, Symons H, et al. HLA-haploidentical donor lymphocyte infusions for patients with relapsed hematologic malignancies after related HLA-haploidentical bone marrow transplantation, *Biol Blood Marrow Transplant* 20 (2014) 314-318.

[225] Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaria C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*. 2010;115(1):107–121.

[226] Choi SW, Braun T, Chang L, et al. Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after related-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15:87-95.

[227] Hechinger AK, Mas K, Dürr C, et al. Inhibition of protein geranylgeranylation and farnesylation protects against graft-versus-host disease via effects on CD4 effector T cells *Haematologica*. 2013 Jan;98(1):31-40.

[228] Hamadani M, Gibson LF, Remick SC, et al. Sibling donor and recipient immune modulation with atorvastatin for the prophylaxis of acute graft-versus-host disease *J Clin Oncol*. 2013 Dec 10;31(35):4416-23.

- [229] Kennedy G, Varelias A, Vuckovic S. The addition of IL6 inhibition to standard GVHD prophylaxis prevents aGVHD: interim results of a phase I/II trial. ASH meeting 2013.
- [230] Cutler C, Kim HT, Bindra B, Sarantopoulos S, Ho VT, Chen YB, et al. Rituximab prophylaxis prevents corticosteroid-requiring chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: results of a phase 2 trial. *Blood* 2013;122 (8):1510-7.
- [231] Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Review). *Blood*. 2001;98(12):3192–3204.
- [232] Urbano-Ispizua A, Rozman C, Pimentel P, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease in patients undergoing transplantation with CD34+ selected blood cells from HLA-identical siblings. *Blood*. 2002;100(2):724–727.
- [233] Pasquini MC, Devine S, Mendizabal A, et al. Comparative outcomes of donor graft CD34+ selection and immune suppressive therapy as graft-versus-host disease prophylaxis for patients with acute myeloid leukemia in complete remission undergoing HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2012;30(26):3194–3201.
- [234] Aversa F, Tabilio A, Velardi A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully

mismatched HLA haplotype. *N Engl J Med.* 1998;339(17):1186–1193.

[235] Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood.* 2014;124:638–644.

[236] Bacigalupo A. Antithymocyte globulin for prevention of graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 12(6):457-62, 2005

[237] Blanco B, Sánchez-Abarca LI, Caballero-Velázquez T. Depletion of alloreactive T-cells in vitro using the proteasome inhibitor bortezomib preserves the immune response against pathogens. *Leuk Res.* 2011 Oct;35(10):1412-5.

[238] Berges C, Haberstock H, Fuchs D, Miltz M, Sadeghi M, Opelz G et al. Proteasome inhibition suppresses essential immune functions of human CD4+ T cells. *Immunology* 2008;124: 234-246,

[239] Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, O'Shaughnessy MJ, Liu H, Barao I, Riordan W, Sitcheran R, Wysocki C, Serody JS, Blazar BR, Sayers TJ, Murphy WJ. Inhibition of acute graft versus host disease with retention of graft versus tumor effects by the proteasome inhibitor Bortezomib. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101: 8120-5.

[240] Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, Garcia M, Ho VT, Armand P, Cutler C, Ritz J, Antin JH, Soiffer RJ, Alyea EP 3rd. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched

unrelated donors. *Blood*. 2009;114:3956-9.

[241] O'Shaughnessy MJ, Vogtenhuber C, Sunb K et al. Ex vivo Inhibition of NF- κ B Signaling in Alloreactive T-cells Prevents Graft-Versus-Host Disease *American Journal of Transplantation* 2009; 9: 452–462

[242] Bastien JP, Roy J, Roy DC. Selective T-cell depletion for haplo- type-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *Semin Oncol*. 2012 Dec;39(6):674-82.

[243] Fuchs EJ. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:230-6.

[244] Raiola AM, Dominiotto A, Ghiso A, Unmanipulated haploidentical bone marrow transplantation and posttransplantation cyclophosphamide for hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 Jan;19(1):117-22.

[245] Solomon S, Mielke S, Savani BN et al. Selective depletion of alloreactive donor lymphocytes: a novel method to reduce the severity of graft-versus-host disease in older patients undergoing matched sibling donor stem cell transplantation. *Blood*. 2005;106:1123-1129.

[246] Davies JK, Gribben JG, Brennan LL et al. Outcome of alloantigenized haploidentical bone marrow transplantation after ex vivo costimulatory blockade: results of 2 phase 1 studies. *Blood* 2008;112(6):2232-41.

- [247] Wehler T, Nonn M, Brandt B, et al. Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. *Blood* 2007 109: 365-373.
- [248] Perruccio K, Topini F, Tosti A et al, Photodynamic purging of alloreactive T cells for adoptive immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*, 2008; 40(1):76-83.
- [249] Perruccio K, Topini F, Tosti A. Optimizing a photoallodepletion protocol for adoptive immunotherapy after haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Sep;47(9):1196-200.
- [250] Daniels J et al. Alloanergized donor T cells results in the generation of allosuppressive CD4+ Treg *Blood* 2008; 112: 207
- [251] Roy DC, Lachance S, Roy J, et al. Donor lymphocytes depleted of alloreactive T-cells (ATIR101) reduce transplant related mortality and improve overall survival in Haploidentical HSCT for Patients with AML and ALL, using an immunosuppressant-free transplant regimen. *Blood*. 2015;126(23):4391.
- [252] Nimer SD, Giorgi J, Gajewski JL, et al. Selective depletion of CD8+ cells for prevention of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. A randomized controlled trial. *Transplantation*. 1994;57(1):82–87.
- [253] Willems E, Baron F, Baudoux E, et al. Non-myeloablative transplantation with CD8-depleted or unmanipulated peripheral blood stem cells: a phase II randomized trial. *Leukemia*. 2009;23(3):608–610.

- [254] Airoidi I, Bertaina A, Prigione I, et al. Gammadelta T-cell reconstitution after HLA-haploidentical hematopoietic transplantation depleted of TCR-alphabeta+/CD19+ lymphocytes. *Blood*. 2015;125(15):2349–2358.
- [255] Bertaina A, Merli P, Rutella S, et al. HLA-haploidentical stem cell transplantation after removal of $\alpha\beta$ + T and B cells in children with nonmalignant disorders. *Blood*. 2014;124(5):822–826.
- [256] Bleakley M, Heimfeld S, Loeb KR, et al. Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts. *J Clin Invest*. 2015;125(7):2677–2689.
- [257] Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2516-20.
- [258] Avet-Loiseau H, Fonseca R, Siegel D. Carfilzomib significantly improves the progression-free survival of high-risk patients in multiple myeloma. *Blood*. 2016 Sep 1;128(9):1174-80.
- [259] San Miguel, J. et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 14, 1055–1066 (2013).
- [260] Información del medicamento. Pomalidomida. AEMPS - CIMA - Fichas de
formatos.

<https://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verPresentaciones&codigo=113850004>.

[261] European Medicines Agency - Find medicine - Imnovid. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002682/human_med_001669.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

[262] Moreau P, Masszi T, Grzasko N. TOURMALINE-MM1 Study Group. Oral Ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016 Apr 28;374(17):1621-34.

[263] Lokhorst, H. M. et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med*. 373, 1207–1219 (2015).

[264] Lonial, S. et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl*. 387, 1551–1560 (2016).

[265] Información del medicamento. Daratumumab. AEMPS - CIMA - Fichas de formatos.
<https://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verPresentaciones&codigo=1161101001>. (Accessed: 16th November 2016)

[266] Dimopoulos, M. A. et al. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med*. 375, 1319–1331 (2016).

[267] Lokhorst, H. et al. International Myeloma Working Group consensus

statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 28, 4521–30 (2010).

[268] Mohamed A Kharfan-Dabaja^{1,2}, Mehdi Hamadani³, Tea Reljic. Comparative efficacy of tandem autologous versus autologous followed by allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Hematology & Oncology* 2013, 6:2.

[269] Martinez-Lopez J1, Blade J, Mateos MV, Grande C, Alegre A, García-Laraña J, Sureda A, de la Rubia J, Conde E, Martinez R, de Arriba F, Viguria MC, Besalduch J, Cabrera R, Gonzalez-San Miguel JD, Guzman-Zamudio JL, Gomez del Castillo MC, Moraleda JM, García-Ruiz JC, San Miguel J, Lahuerta JJ; Grupo Español de MM; Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatía Maligna. Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation.

Blood. 2011 Jul 21;118(3):529-34.

[270] Kröger N, Badbaran A, Zabelina T, et al. Impact of high-risk cytogenetics and achievement of molecular remission on long-term freedom from disease after autologous-allogeneic tandem transplantation in patients with multiple myeloma.

Biol Blood Marrow Transplant. 2013 Mar;19(3):398-404.

[271] Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S. Treatment of multiple myeloma

with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood*. 2016 Jun 16;127(24):2955-62.

[272] Kröger N, Zabelina T, Alchalby H. Dynamic of bone marrow fibrosis regression predicts survival after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Jun;20(6):812-5.

[273] Kröger N, Zabelina T, Klyuchnikov E, Kropff M, Pflüger KH, Burchert A, Stübiger T, Wolschke C, Ayuk F, Hildebrandt Y, Bacher U, Badbaran A, Schilling G, Hansen T, Atanackovic D, Zander AR. Toxicity-reduced, myeloablative allograft followed by lenalidomide maintenance as salvage therapy for refractory/relapsed myeloma patients. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Mar;48(3):403-7.

[274] Garderet L, Cook G, Auner HW, Bruno B, Lokhorst H, Perez-Simon JA, Sahebi F, Scheid C, Morris C, van Biezen A, Sobh M, Michallet M, Gahrton G, Schönland S, Kröger N. Treatment options for relapse after autograft in multiple myeloma - report from an EBMT educational meeting. *Leuk Lymphoma*. 2017 Apr;58(4):797-808.

[275] Bensinger W, Rotta M, Storer B. Allo-SCT for multiple myeloma: a review of outcomes at a single transplant center. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Oct;47(10):1312-7.

[276] Pérez-Simón JA¹, Martino R, Alegre A, Tomás JF, De Leon A, Caballero D, Sureda A, Sierra J, San Miguel JF. Chronic but not acute graft-versus-host

disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation. *Br J Haematol.* 2003 Apr;121(1):104-8.

[277] Kröger N, Perez-Simon JA, Myint H, Klingemann H, Shimoni A, Nagler A, Martino R, Alegre A, Tomas JF, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Fauser A, Sayer HG, Leon A, Beyer J, Zabelina T, Ayuk F, San Miguel JF, Brand R, Zander AR. Relapse to prior autograft and chronic graft-versus-host disease are the strongest prognostic factors for outcome of melphalan/fludarabine-based dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2004 Oct;10(10):698-708.

[278] Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (bortezomib). *Cancer Invest* 2004; 22:304-311.

[279] Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research* 1999; 59: 2615-262.

[280] L. Caballero-Velázquez T, López-Corral L, Encinas C, et al. Phase II clinical trial for the evaluation of bortezomib within the reduced intensity conditioning regimen (RIC) and post-allogeneic transplantation for high-risk myeloma patients. *Br J Haematol.* 2013 162:474-82.

[281] Nishihori T, Ochoa Bayona JL, Kim J, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for consolidation of VGPR or CR for newly diagnosed

multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2013 48:1179-84.

[282] Giralt S, Koehne G: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: What place, if any? *Curr Hematol Malig Rep* 2013;8:284-290.

[283] Lokhorst H, Einsele H, Vesole D, et al. International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2010 10;28:4521-30.

[284] Bensinger W. Allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 28:891-902.

[285] Cutler C, Stevenson K, Kim HT. Sirolimus is associated with veno-occlusive disease of the liver after myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4425-31.

[286] Vakkila J, Thomson AW, Hovi L, Vettenranta K, Saarinen-Pihkala UM. Circulating dendritic cell subset levels after allogeneic stem cell transplantation in children correlate with time post transplant and severity of acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35: 501–507.

[287] Mohty M, Blaise D, Faucher C, Bardou VJJ, Gastaut JAA, Viens P et al. Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2005; 19: 1–6.

[288] Hagendorens MM, Ebo DG, Schuerwegh AJ, Huybrechts A, Van Bever HP, Bridts CH et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord

blood and peripheral blood of healthy and allergic children. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 633–639.

[289] Cseh A, Vasarhelyi B, Molnar K, Szalay B, Svec P, Treszl A et al. Immune phenotype in children with therapy-naïve remitted and relapsed Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 6001–6009.

[290] Maecker B, Mougiakakos D, Zimmermann M, Behrens M, Hollander S, Schrauder A et al. Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 645–649.

[291] Huenecke S, Cappel C, Esser R, Pfirrmann V, Salzmann-Manrique E, Betz S, et al. Development of Three Different NK Cell Subpopulations during Immune Reconstitution after Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Prognostic Markers in GvHD and Viral Infections. *Front Immunol.* 2017 Feb 10;8:109.

ANEXO:

RELACIÓN DE FIGURAS Y

TABLAS

RELACIÓN DE FIGURAS:

Figura 1. Complejo mayor de histocompatibilidad (pág. 37)

Figura 2. Regulación del linfocito T por CD28 y CTLA-4 [13] (pág. 39)

Figura 3. Vías de señalización de los PRR [19] (pág. 43)

Figura 4. Tolerancia central y periférica frente a antígenos propios [3] (pág. 45)

Figura 5. Proceso de presentación de antígeno por APC [21] (pág. 46)

Figura 6. Reconocimiento de complejos convencionales y alogénicos por el linfocito T (pág. 53)

Figura 7. A. Dominios de alfa1alfa2 de Ld-QL9 y Kb-dEV8 en cada complejo 2C. B. En la superposición inversa a (A), el módulo VaVb 2C se superpuso desde cada complejo para ver las rotaciones relativas de las hélices del CMH [57] (pág. 57)

Figura 8. Las tres fases de la inmunobiología de la EICH [75] (pág. 61)

Figura 9. Fase 2: Activación de células T del donante [76] (pág. 62)

Figura 10. Fase efectora de la EICH [76] (pág. 69)

Figura 11. Patofisiología de la EICR crónica. Linfocitos B y EICR crónica [124] (pág. 74)

Figura 12. Dianas de terapias estándar y nuevas terapias para la prevención de EICR aguda [153] (pág. 85)

Figura 13. Estructura química bortezomib (pág. 94)

Figura 14. Estructura proteosoma (pág. 95)

Figura 15. Ubiquitinación y degradación de I κ B por el proteosoma [211] (pág. 98)

Figura 16. Inhibición sinérgica de la activación con bortezomib y sirolimus mediante la expresión de CD25 y la producción de IFN γ [219] (pág. 100)

Figura 17. Viabilidad celular medida por citometría de flujo mediante marcaje con anexina V y 7AAD (pág. 109)

Figura 18. Comparación de linfocitos alorreactivos antes y después de tratamiento por análisis de dilución límite y citometría de flujo. El análisis de dilución límite es más sensible que la citometría de flujo [249] (pág. 113)

Figura 19. SG autólogo-alogénico vs autólogo en tándem [268] (pág. 120)

Figura 20. Comparación CMN del donante:CMN del receptor depelcionadas de CD3 en proporción 1:1 y 3:1 (pág. 170)

Figura 21. Medición de la activación linfocitaria usando el marcador CD25 (pág. 171)

Figura 22. Medición de la activación linfocitaria usando el marcador CD69 (pág. 172)

Figura 23. Proceso de alodepleción (pág. 173)

Figura 24. Comparación pre y postcongelación de muerte celular, linfocitos alorreactivos y no alorreactivos a distintas concentraciones de bortezomib (pág. 174)

Figura 25. A. Porcentaje de linfocitos no alorreactivos y B alooreactivos con TEXMAX y Alpha MEM (pág. 176)

Figura 26. Comparación de los medios de cultivo TEX MACS y α -MEM en términos de viabilidad celular (pág. 178)

Figura 27. Representación de la bolsa 3 por citometría de flujo. La destrucción o muerte celular fue medida mediante citometría de flujo usando el marcador 7AAD y la activación por CD25 (pág. 182)

Figura 28. Representación de bolsa 3. A. Porcentaje de linfocitos T y aquellos alorreactivos. B. Representación en bolsa 3 de porcentaje de linfocitos T alorreactivos vs muertos (pág. 183)

Figura 29. Cultivo mixto del producto alodeplecionado frente a CMN-CD3 de receptor comparado con cultivo mixto control con linfocitos no alodeplecionados (pág. 186)

Figura 30. Respuesta frente a patógeno de linfocitos T CD3 del donante descongelado vs overnight (pág. 187)

Figura 31. Esquema de trabajo para valorar citotoxicidad y activación del producto alodeplecionado (pág. 188)

Figura 32. Citotoxicidad al enfrentar células del receptor a donante y un tercer individuo (pág. 189)

Figura 33. Porcentaje de linfocitos alorreactivos al comparar bolsa control con bolsa con adición de bortezomib (pág. 190)

Figura 34. Resultado del procedimiento de alodepleción con bortezomib a 10 nM (pág. 191)

Figura 35. Células dendríticas (pág. 195)

Figura 36. Linfocitos totales y comparación CD3/linfocitos B/NK (pág. 196)

Figura 37. Linfocitos T CD4 y CD8 (pág. 196)

Figura 38. Linfocitos T reguladores (pág. 197)

Figura 39. Células NK (pág. 197)

Figura 40. INF y CD40L (pág. 198)

Figura 41. CMV y VEB (pág. 198)

Figura 42. EICR aguda grados 2-4 (pág. 206)

Figura 43. EICR aguda grados 3-4 (pág. 206)

Figura 44. EICR crónica (pág. 207)

Figura 45. Mortalidad no relacionada con la recaída (MnRR) (pág. 208)

- Figura 46. Mortalidad relacionada con la recaída (MRR)** (pág. 208)
- Figura 47. Supervivencia global (SG)** (pág. 209)
- Figura 48. Supervivencia libre de evento (SLE)** (pág. 210)
- Figura 49. Supervivencia libre de progresión (SLP)** (pág. 210)
- Figura 50. Supervivencia libre de recaída (SLR)** (pág. 211)
- Figura 51. Porcentaje de células dendríticas plasmocitoides** (pág. 214)
- Figura 52. Porcentaje de los linfocitos** (pág. 218)
- Figura 53. Distribución de linfocitos T CD4 y CD8** (pág. 219)
- Figura 54. Porcentaje de los linfocitos B** (pág. 219)
- Figura 55. Linfocitos CD4+ naive/memoria** (pág. 222)
- Figura 56. Linfocitos CD8+ naive/memoria** (pág. 223)
- Figura 57. Células NK bright/weak** (pág. 225)
- Figura 58. IFN y CD40L intracitoplasmático** (pág. 227)

RELACIÓN DE TABLAS:

- Tabla 1. Marcadores de linfocitos T reguladores** (pág. 51)
- Tabla 2. Estadiaje y clasificación de la EICR aguda (clasificación de Glucksberg)** (pág. 80)
- Tabla 3. Clasificación de la EICR crónica** (pág. 82)
- Tabla 4. Anticuerpos monoclonales utilizados en el estudio** (pág. 148)
- Tabla 5. Comparación del producto alodeplecionado en fresco vs descongelado** (pág. 175)
- Tabla 6. Linfocitos alorreactivos vs no alorreactivos tras bortezomib** (pág. 177)
- Tabla 7. Condiciones de trabajo por bolsas** (pág. 180)
- Tabla 8. Representación de los porcentajes de las distintas poblaciones celulares** (pág. 181)
- Tabla 9. Condiciones de trabajo en cada paciente** (pág. 184)

Tabla 10. Tres experimentos testando ciclofosfamida a distintas concentraciones sola vs ciclofosfamida y bortezomib a distintas concentraciones (pág. 192)

Tabla 11. Repetición de experimento previo y uso de donante alternativo (donante B) (pág. 193)

Tabla 12. Características basales pretrasplante (pág. 200)

Tabla 13. Características basales por paciente (pág. 201)

Tabla 14. Datos relacionados con el trasplante (pág. 204)

Tabla 15. Datos pre y postrasplante (pág. 201)

Tabla 16. Porcentajes de granulocitos y monocitos (pág. 213)

Tabla 17. Medias y error estándar de las poblaciones de CDs (pág. 215)

Tabla 18. Porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias (pág. 217)

Tabla 19. Distribución de los linfocitos T CD4 naïve/memoria/efector (pág. 221)

Tabla 20. Distribución de los linfocitos T CD8 naïve/memoria/efector (pág. 222)

Tabla 21. Porcentaje y número de linfocitos T reguladores (pág. 223)

Tabla 22. Subpoblaciones de células NK (pág. 224)

Tabla 23. Porcentaje de células NK+ para CD16 y CD94 (pág. 225)

Tabla 24. Porcentaje de células NK+ CD158a, CD161, NK (pág. 226)

Tabla 25. Niveles de IFN y CD40L intracitoplasmático (pág. 227)

Tabla 26. Quimerismo en linfocitos B de memoria CD27+ (pág. 229)